

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
CAMPUS PALOTINA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO
ATIVIDADES DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO
OBRIGATÓRIO

Área: Controle de qualidade e Inspeção de Produtos de Origem
Animal

Aluna: Andressa Maisa Schneider
Orientadores: Prof. Dra. Vanerli Beloti,
Prof. Fabio Sossai Possebon,
Médica Veterinária Monica Casali
Supervisor: Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como parte das exigências para
conclusão do Curso de Graduação em
Medicina Veterinária da Universidade Federal
do Paraná.

PALOTINA – PR
Dezembro de 2016

AGRADECIMENTOS

Obrigada Deus, por todas as oportunidades que colocou na minha vida, por sempre atender minhas preces, por estar ao meu lado e me dar forças para superar todos os momentos de dificuldade encontrados durante a graduação.

Ao meu pai, Eliseu, minha mãe Izete e meu irmão João Vitor, agradeço imensamente por serem a melhor família do mundo, por todo o apoio que me deram nos últimos cinco anos, por todos os bons momentos que proporcionaram durante toda a minha vida, obrigada por sempre acreditarem no meu potencial e sempre me apoiarem nas decisões mais importantes já tomadas na minha vida. Um agradecimento especial aos meus avós, vó Erca, vó Maria e vô Léo, pelo amor incondicional que recebo de vocês, e por me incluírem em todas as suas orações.

À minha família Palotinese, Bruna e Luana, obrigada por terem sido as melhores colegas e amigas de apartamento, só estando longe percebi o quanto a bagunça de vocês me faz falta. Agradeço aos demais amigos que Palotina me trouxe, Estela, Sarah, Ander, Fabi, Aline, Kauane, André, Juliane, Ricardo, Lari, Dani, Julia, vocês tornaram Palotina uma cidade muito mais animada e feliz.

Agradeço imensamente por ter sido tão bem acolhida pelo LACOMA, obrigada Kadigia, Mallú, Rosa, Thiago, Maíra e Cibeli, e a todos os mestrands e estagiários. Um agradecimento especial ao Professor Luciano Bersot, que sempre terá toda a minha admiração, por de certa forma ter construído o LACOMA, e o tornado um laboratório de referência nacional em microbiologia e inspeção de alimentos. Além disso lhe agradeço por todas as oportunidades, pelas excelentes aulas, por toda a orientação e conselhos, e por ter aceitado ser meu orientador de estágio.

Obrigada UFPR Palotina por ter proporcionado a minha formação como Médica Veterinária, obrigada à todos os professores da UFPR pelo excelente trabalho que cada um desenvolve, e obrigada principalmente à todos os meus colegas da turma XXIII, de longe a melhor turma da veterinária, amo cada um de vocês de uma maneira única, dividi com vocês os cinco melhores anos da minha vida.

Agradeço também todos os residentes, professores, estagiários, mestrands, e técnicos do LIPOA e do SOAP e à todos os funcionários da C.Vale, pois fui extremamente bem recebida em todos os lugares. Agradeço imensamente por todo o conhecimento que obtive durante esses meses de estágio, e principalmente pelas amizades que fiz, apesar de estarem distante, lembrarei de vocês sempre.

RESUMO

O presente relatório discorre sobre as atividades desenvolvidas durante o estágio supervisionado obrigatório, na área de Microbiologia, Inspeção e Controle de Qualidade de Produtos de Origem Animal, como atividades da disciplina de Estágio Supervisionado Obrigatório da Universidade Federal do Paraná - Setor Palotina. O estágio foi realizado no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA) da Universidade Estadual de Londrina, de 18 de Julho à 19 de Agosto de 2016, sob a orientação da Prof. Dra. Vanerli Beloti. No Serviço de Orientação à Alimentação Pública (SOAP) da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus de Botucatu, no período de 22 de Agosto à 22 de Setembro de 2016, sob a orientação do Prof. Fabio Sossai Possebon. No abatedouro de aves da C.Vale - Cooperativa Agroindustrial, localizado na cidade de Palotina - Paraná, no período de 26 de Setembro à 25 de Novembro de 2016, sob orientação da Médica Veterinária encarregada pelo controle de qualidade Monica Casali, sob a supervisão local do Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot. São contemplados neste Trabalho de Conclusão de Curso os elementos descritivos constantes no Plano de Atividades do Estágio. O objetivo deste relatório foi descrever a experiência acadêmica e as atividades desenvolvidas durante o estágio curricular na área de Microbiologia, Inspeção e Controle de Qualidade de Produtos de Origem Animal, principalmente com relação a rotina de ambos os laboratórios, na realização das análises microbiológicas e análises físico-químicas dos alimentos, e acompanhamento das atividades realizadas pela gestão da qualidade do abatedouro de aves da C.Vale, com o objetivo final de garantir a qualidade e a segurança do produto que chega ao consumidor.

Palavras-chave: análises físico-químicas; análises microbiológicas; controle de qualidade.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal.....	13
FIGURA 2. Análise de Fosfatase Alcalina negativa e positiva.....	16
FIGURA 3. Resultado positivo para Peroxidase.....	17
FIGURA 4. Leitura da Prova de Alizarol.....	18
FIGURA 5. Titulação da acidez pelo método Dornic.....	19
FIGURA 6. Determinação da densidade com termolactodensímetro.....	20
FIGURA 7. Determinação da gordura em Butirômetro de Gerber.....	21
FIGURA 8. Placa de XLD com colônias características de <i>Salmonella</i>	26
FIGURA 9. Placa de BPLS com colônias características de <i>Salmonella</i>	26
FIGURA 10. Tubo contendo caldo LST positivo.....	27
FIGURA 11. Tubos contendo Caldo VBBL positivos para coliformes totais.....	28
FIGURA 12. Tubo contendo Caldo EC positivo para coliformes termotolerantes.....	29
FIGURA 13. Serviço de Orientação à Alimentação Pública.....	31
FIGURA 14. Petrifilm com colônias de mesófilos.....	33
FIGURA 15. Determinação da acidez do mel.....	40
FIGURA 16. Resultado positivo para diástase.....	41
FIGURA 17. Reação de Fiehe negativa.....	42
FIGURA 18. Precipitação de substâncias albuminoides presentes no mel.....	43
FIGURA 19. Titulação de acidez pelo método Dornic para leite humano.....	45
FIGURA 20. Medição dos componentes do leite materno com régua.....	46
FIGURA 21. Aferição de pH da carne.....	48
FIGURA 22. Reação de Éber negativa e positiva para gás sulfídrico.....	49
FIGURA 23. Reação de Éber positiva para amônia.....	50
FIGURA 24. Determinação do pH da água com o auxílio de um pHmetro.....	51
FIGURA 25. Determinação da dureza da água.....	52
FIGURA 26. Cubetas de acrílico para leitura da absorbância.....	54
FIGURA 27. Amostras negativas para a análise de matéria orgânica em água.....	55
FIGURA 28. Pesagem do resíduo mineral fixo.....	57
FIGURA 29. Amostras dessecadas, em dessecador com sílica gel.....	58
FIGURA 30. Determinação da dosagem de nitrogênio através de titulação.....	59
FIGURA 31. Pesagem de extrato etéreo contido no copo de Soxhlet	61
FIGURA 32. Titulação de cloretos.....	61

FIGURA 33. Complexo avícola da C.Vale.....	63
FIGURA 34. Galpão de espera.....	66
FIGURA 35. Pendura de aves vivas.....	67
FIGURA 36. Representação da Cuba de atordoamento com nória para frangos.....	69
FIGURA 37. Corpos de prova para o detector de metais.....	78
FIGURA 38. Palete na doca de expedição.....	80

LISTA DE ABREVIações

ACMX	Sistema de Corte Automático
ACP	Auxiliar do Controle de Produção
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
APT	Água Peptonada Tamponada
BRC	British Retail Consortium
BC	Ágar Bacillus cereus
BP	Baird-Parker
BPF	Boas Práticas de Fabricação
BPLS	Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose
Ca ⁺²	Cálcio
CaCO ₃	Carbonato de Cálcio
CO ₂	Dióxido de Carbono
CMS	Carne Mecanicamente Separada
CMR	Carne Mecanicamente Recuperada
EC	Caldo E. coli
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EPI	Equipamento de Proteção Individual
EUA	Estados Unidos da América
ESD	Extrato Seco Desengordurado
EST	Extrato Seco Total
fc	Fator de Correção
GTA	Guia de Trânsito Animal
H ₂ S	Sulfeto de Hidrogênio
H ₂ O	Água
HMF	Hidroximetilfurfural
IN	Instrução Normativa
IQF	Individual Quick Frozen
ISO	International Organization for Standardization
KMnO ₄	Permanganato de potássio
LIPOA	Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal
LST	Lauril Sulfato Triptose

MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Mg ⁺²	Magnésio
MS	Ministério da Saúde
NaOH	Hidróxido de sódio
NMP	Número mais provável
ONU	Organização das Nações Unidas
pH	Potencial Hidrogeniônico
PCA	Ágar Padrão para Contagem
PCC	Ponto Crítico de Controle
PCR	Reação em cadeia da polimerase
POP	Procedimento Operacional Padrão
PPHO	Procedimento Padrão de Higiene Operacional
PSO	Procedimento Sanitário Operacional
RDC	Reunião da Diretoria Colegiada
RMF	Resíduo Mineral Fixo
rpm	Rotação por minuto
RVS	Rappaport Vassiliadis Soja
BS	Bismuto Sulfito
SIF	Serviço de Inspeção Federal
SNG	Sólidos Não Gordurosos
SOAP	Serviço de Orientação à Alimentação Pública
ST	Sólidos Totais
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UHT	Ultra High Temperature
UNESP	Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
VBBL	Verde Brilhante Bile Lactose
XLD	Xilose Lisina Desoxicolat

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. DESCRIÇÃO DO LOCAL DO ESTÁGIO	12
2.1. ÁREA FÍSICA DO LIPOA.....	12
3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	14
3.1. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	14
3.1.1. Índice Crioscópico.....	14
3.1.2. Fosfatase Alcalina.....	15
3.1.3. Peroxidase.....	16
3.1.4. Prova do alizarol.....	17
3.1.5. Titulação da acidez pelo método Dornic.....	18
3.1.6. Determinação da Densidade relativa.....	19
3.1.7. Determinação da Gordura	20
3.1.8. Sólidos Totais ou Extrato Seco Total.....	21
3.1.9. Sólidos Não Gordurosos ou Extrato Seco Desengordurado.....	22
3.2. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	23
3.2.1. Diluição de amostras.....	23
3.2.2. Mesófilos.....	23
3.2.3. <i>Salmonella</i> sp.....	24
3.2.4. NMP de Coliformes a 35°C e a 45°C.....	26
4. DESCRIÇÃO DO LOCAL DO ESTÁGIO.....	30
4.1. ÁREA FÍSICA DO SOAP.....	30
5. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	32
5.1. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	32
5.1.1. <i>Staphylococcus</i> sp.....	34
5.1.2. <i>Bacillus cereus</i>	35
5.1.3. Clostrídios Sulfito Redutores a 46°C.....	36
5.2. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	38
5.2.1. Mel.....	38
5.2.1.1. Umidade.....	38
5.2.1.2. Determinação da Acidez.....	39
5.2.1.3. Pesquisa de Diastase.....	40
5.2.1.4. Reação de Fiehe.....	41

5.2.1.5. Determinação de Hidroximetilfurfural (HMF).....	42
5.2.1.6. Prova de Lund.....	43
5.2.2. Leite.....	44
5.2.2.1.. Acidez Dornic.....	44
5.2.2.2. Crematócrito.....	45
5.2.3. Carnes.....	46
5.2.3.1. Características sensoriais.....	46
5.2.3.1.1. Aparência.....	46
5.2.3.1.2. Textura.....	47
5.2.3.1.3. Odor.....	47
5.2.3.2. Aferição do pH.....	47
5.2.3.3. Reação de Éber para gás sulfídrico (H ₂ S)	48
5.2.3.4. Reação de Éber para amônia.....	48
5.2.4. Água.....	50
5.2.4.1. Análises sensoriais.....	50
5.2.4.2. Determinação do pH.....	51
5.2.4.3. Determinação da dureza.....	51
5.2.4.4. Nitrogênio Amoniacal.....	53
5.2.4.5. Cloro residual livre.....	53
5.2.4.6. Matéria orgânica.....	54
5.2.5. Produtos de cesta básica.....	56
5.2.5.1. Resíduo Mineral Fixo (RMF ou Cinzas)	56
5.2.5.2. Umidade.....	57
5.2.5.3. Determinação de Proteínas.....	58
5.2.5.4. Determinação de Lipídios.....	60
5.2.5.5. Determinação de cloretos.....	61
6. DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO.....	62
6.1. ÁREA FÍSICA DA C.VALE.....	62
7. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	64
7.1. PROCESSO PRODUTIVO E AÇÃO DOS OPERADOREs DE QUALIDADE.....	64
7.1.1. Recepção das aves.....	64
7.1.2. Galpão de espera.....	65
7.1.3. Descarregamento e lavagem de gaiolas e caminhão.....	66

7.1.4. Pendura.....	67
7.1.5. Insensibilização.....	67
7.1.6. Sangria.....	69
7.1.7. Escaldagem.....	70
7.1.8. Depenagem.....	70
7.1.9. Corte de pés e cabeça.....	71
7.1.10. Evisceração.....	71
7.1.11. Resfriamento de carcaças e vísceras.....	73
7.1.12. Gotejamento.....	74
7.1.13. Cortes e Embalagem primária.....	75
7.1.14. Embalagem secundária.....	77
7.1.15. Paletização.....	78
7.1.16. Expedição.....	79
7.2. GESTÃO DA QUALIDADE.....	80
7.2.1. Sistema de qualidade ISO 9001.....	81
7.2.2. Norma BRC.....	81
7.2.3. Programa 5S.....	82
7.2.4. Programas de autocontrole.....	82
7.2.4.1. Programa HACCP/APPCC.....	83
7.2.4.2. Procedimento Padrão de Higiene Operacional (PPHO).....	84
7.2.4.3. Boas Práticas de Fabricação (BPF).....	85
8. CONCLUSÃO.....	86
9. REFERÊNCIAS.....	87

INTRODUÇÃO

A alimentação é um fator primordial tanto para a vida humana quanto animal, e atualmente, com o grande crescimento populacional, a demanda por alimentos cresceu substancialmente. Segundo um informe realizado pela ONU para a Alimentação e Agricultura, a demanda por alimentos crescerá cerca de 70% nos próximos anos, já que a população mundial deverá chegar à 9 bilhões até 2050 (FAO, 2016). Mas tão importante quanto assegurar a oferta de alimentos, é garantir a qualidade e a segurança dos alimentos produzidos, visando sempre a saúde do consumidor, visto que, os alimentos podem ser carreadores de inúmeras enfermidades, constituindo uma grande preocupação para a saúde pública mundial.

De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos EUA, anualmente 1 em cada 9 americanos adoece pelo consumo de alimentos contaminados (CDC, 2015). Dentre as complicações causadas pelo consumo de alimentos contaminados, os sintomas gastrointestinais, como vômito e diarreia, são mais comumente observados, entretanto, outras complicações como sintomatologia neurológica e disfunções musculares também podem estar presentes, principalmente em crianças, idosos e indivíduos imunocomprometidos (USDA, 2012; BELOTI, 2015; SILVA et al., 2010).

Atualmente o Brasil possui grande importância na produção de alimentos, principalmente de origem animal, de acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, o Brasil é o segundo maior produtor mundial de frangos, assumindo a liderança nas exportações (USDA, 2015), além de produzir grandes quantidades de leite e derivados lácteos, sendo o quinto maior produtor mundial de leite (USDA, 2016).

Devido à grande produção nacional e a forte relação com as infecções alimentares causadas pelo consumo de alimentos contaminados, é de suma importância que as indústrias garantam a higiene e a segurança dos alimentos produzidos, realizando o controle minucioso sobre todo processo de produção, sendo este controle, realizado principalmente pela Gestão da qualidade. Além do controle na indústria, as análises microbiológicas e físico-químicas dos alimentos são indispensáveis, pois a avaliação da qualidade de um produto fornece informações que permitem avaliá-lo quanto as condições de processamento, armazenamento e distribuição para o consumo, sua vida útil e o risco que pode fornecer ao consumidor (USDA, 2012; FRANCO & LANDGRAF, 2008).

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

2. DESCRIÇÃO DO LOCAL DO ESTÁGIO

Parte do estágio supervisionado obrigatório foi realizado no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA) do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual de Londrina (UEL), sob orientação da Professora Doutora Vanerli Beloti, no período compreendido entre 18 de Julho à 19 de Agosto de 2016.

O LIPOA se localiza no Hospital Veterinário, no Centro de Ciências Agrárias, no campus da UEL. Desde 1990 presta serviços em análises físico-químicas e microbiológicas de leite e derivados, bem como consultorias a produtores, órgãos públicos e indústrias de laticínios, na área de qualidade do leite. Além disso, o LIPOA está integrado ao Centro Mesorregional de Excelência em Tecnologia do Leite do Norte Central que visa apoiar as ações e projetos para o desenvolvimento da pecuária leiteira em execução na região (UEL, 2016).

O LIPOA é um dos laboratórios credenciados para a realização de análises microbiológicas e físico-químicas para verificação da qualidade e da segurança do leite do Programa Leite das Crianças – Paraná, instituído em 14 de maio de 2003, que tem por objetivo auxiliar o combate à desnutrição infantil, por meio da distribuição gratuita e diária de um litro de leite às crianças de 06 a 36 meses, pertencentes a famílias cuja renda per capita não ultrapasse meio salário mínimo regional (PARANÁ, 2004).

2.1. ÁREA FÍSICA DO LIPOA

O LIPOA (Figura 1) conta com uma sala de recebimento de amostras e atendimento aos clientes, uma sala destinada ao preparo de meios de cultura e de todo o material que é utilizado no laboratório, e possui uma sala específica onde são distribuídos os meios de cultura. Há uma Sala de paramentação, utilizada para troca de jalecos e higienização das mãos que deve ser realizada antes e depois das análises. Parte do LIPOA é destinada ao laboratório de microbiologia, que dispõem de uma sala destinada a realização das etapas iniciais das análises microbiológicas de leites e derivados lácteos. Uma sala de repique, onde são realizadas as análises

microbiológicas subsequentes, que envolvam meios contaminados, e uma sala de incubação, destinada a incubação dos meios de cultura e também para a leitura das análises. Além de análises microbiológicas, no LIPOA também são realizadas análises físico-químicas de leite e derivados lácteos, em sala específica para este fim. O LIPOA dispõem de uma sala de armazenamento de amostras e culturas e uma sala de lavagem e descarte de materiais contaminados.



FIGURA 1. Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (Fonte: www.uel.br/laboratorios/inspecao/portal/).

3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

3.1. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas saudáveis, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2002). É um fluido biológico complexo com quantidades consideráveis de proteínas, carboidratos, gordura, vitaminas, sais e água. Conforme a IN nº 62 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), para o leite ser considerado normal ele deve ter no mínimo 3,0% de gordura, 2,9% de proteína, 8,4% de sólidos não gordurosos, e atender aos parâmetros físico-químicos e microbiológicos estabelecidos (BRASIL, 2011a).

As análises físico-químicas são essenciais para avaliar a normalidade do leite, seu valor alimentar, rendimento industrial e detecção de possíveis fraudes. Na rotina do LIPOA realizavam-se análises de leites pasteurizados do Programa Leite das Crianças do estado do Paraná, os quais eram submetidos às análises de Índice Crioscópico, Peroxidase e Fosfatase Alcalina, mas durante o período do estágio, também tive a oportunidade de acompanhar a Prova do Alizarol, Titulação de Acidez pelo Método de Dornic, Prova da Densidade, Gordura, Sólidos Totais e Sólidos não Gordurosos.

3.1.1. Índice Crioscópico

O Índice Crioscópico é a medida da depressão do ponto de congelamento do leite em relação ao da água, essa prova é utilizada principalmente para detectar fraude por adição de água ao leite. A determinação do índice crioscópico consiste no super resfriamento de uma alíquota de 2,5 ml de leite até -3°C, seguido de uma imediata descristalização da amostra que é induzida por vibração mecânica. Isto induz uma elevação rápida na temperatura da amostra, com consequente liberação de calor de fusão até alcançar o “plateau”, que corresponde ao índice de crioscopia da amostra ou ao ponto de equilíbrio entre os estados líquido e de congelamento (BRASIL, 2011b).

Seguindo as recomendações do fabricante realizava-se o procedimento de calibração do crioscópio, com as soluções padrão. De acordo com a legislação,

efetuava-se três determinações para cada amostra em três tubos distintos, limpando cuidadosamente o sensor e o agitador com água e secando delicadamente com papel absorvente. O índice crioscópico é fornecido na escala de Hortvet ($^{\circ}\text{H}$), que pode se equivaler pelas equações $T(^{\circ}\text{C}) = 0,9656 \times T(^{\circ}\text{H})$ equivale a $T(^{\circ}\text{H}) = 1,0356 \times T(^{\circ}\text{C})$ (BRASIL, 2006a). O ponto de congelamento do leite aceito pela legislação brasileira deve estar entre $-0,530^{\circ}\text{H}$ e $-0,550^{\circ}\text{H}$ (BRASIL, 2011a). Os resultados dos testes devem ser próximos, com uma tolerância de mais ou menos 2 miligraus ($\pm 0,002^{\circ}\text{H}$) e são expressos pelo cálculo da média aritmética das leituras das amostras (BRASIL, 2006a).

De acordo com Beloti (2015) índices crioscópicos mais negativos do que $-0,550^{\circ}\text{H}$ podem significar que o leite está ácido, pois a crioscopia é afetada pelo ácido láctico, que fica em solução, e aprofunda o ponto de congelamento do leite, ou então, fraude por adição de água e solutos, por adição de neutralizantes como bicarbonato de sódio, ou pela adição de álcool.

A adição de água altera o índice crioscópico do leite fazendo com que o mesmo aumente em direção ao ponto de congelamento da água (0°C) e isso acontece porque a adição de água dilui as concentrações dos componentes que estão em solução no leite, principalmente a lactose e os sais minerais (BRASIL, 2011b). Os solutos são adicionados ao leite juntamente com a água, na tentativa de recompor o ponto de congelamento do leite e mascarar a fraude (BELOTI, 2015).

3.1.2. Fosfatase Alcalina

A fosfatase alcalina é uma enzima naturalmente presente no leite, com grande importância no controle do tratamento térmico aplicado ao leite, pois as temperaturas de $62,8^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos ou $71,8^{\circ}\text{C}$ por 15 segundos, aplicadas comercialmente para a pasteurização, eliminam os microrganismos patogênicos e também a atividade enzimática da fosfatase alcalina, então para o leite ser considerado seguro para consumo, a fosfatase alcalina deve estar ausente (BELOTI, 2015). Se a fosfatase alcalina estiver presente no leite pasteurizado, significa que a pasteurização do leite não atingiu a temperatura necessária para inativação de patógenos.

No LIPOA a verificação da atividade enzimática é feita utilizando-se o Kit Fosfatase Alcalina Teste Colorimétrico Bioclin®, seguia-se as recomendações do fabricante, adiciona-se 50 μl do reagente 1 (Substrato), 500 μl do reagente 2 (Tampão)

e 50 µl de leite, então incuba-se a 37°C por 10 minutos. Após incubação, adiciona-se 2 ml do reagente de cor. A leitura da análise pode ser feita a olho nu, onde a coloração amarela indica fosfatase negativa, e a coloração azul indicará fosfatase positiva (Figura 2). De acordo com os parâmetros da legislação, para leite cru a análise de fosfatase deve ser positiva e para leite pasteurizado, a análise deve ser negativa, já no leite UHT, o teste não é realizado rotineiramente, pois a temperatura para a esterilização atinge os 150°C, inativando a enzima (BRASIL, 2002).



FIGURA 2. Análise de Fosfatase Alcalina negativa e positiva (Fonte: Arquivo pessoal).

3.1.3. Peroxidase

A peroxidase também é uma enzima naturalmente presente no leite, no entanto a sua resistência à temperatura é maior do que a da fosfatase. No processo de pasteurização, o leite sofre o aquecimento rápido a uma temperatura entre 72-75°C seguido pelo resfriamento a 4°C, nesta temperatura a enzima peroxidase permanece ativa. A sua inativação ocorre aos 85°C e deve, portanto, estar intacta no leite pasteurizado, o resultado negativo, neste caso, é indício de sobreaquecimento do leite, que não é permitido no Brasil, por outro lado, no processo de obtenção do leite tipo UHT o aquecimento ocorre a temperaturas mais altas (150°C), o que provoca a negativação do ensaio (BRASIL, 2012).

A pesquisa da enzima é feita através da adição de peróxido de hidrogênio e guaiacol à amostra do leite. A peroxidase, ao hidrolisar o peróxido de hidrogênio, libera oxigênio, que oxida o guaiacol, e altera sua tonalidade originalmente incolor, para a forma oxidada de cor salmão (BRASIL, 2012). Para realização do procedimento oficial da prova transfere-se 10 ml da amostra para um tubo de ensaio, aquece em banho-

maria a 45°C por 5 minutos, para ativação da enzima. Acrescenta-se então 2 ml da solução hidroalcolica de guaiacol a 1% nas paredes dos tubos de ensaio, seguindo-se de adição de 3 gotas de solução de peróxido de hidrogênio a 3% (BRASIL, 2006a).

No LIPOA a pesquisa de peroxidase em leite fluído é realizada por metodologia própria, utilizando-se 2 ml de leite e 2 ml de guaiacol, seguindo-se da adição de 3 gotas da solução de peróxido de hidrogênio a 3%. O aquecimento é realizado como confirmatório apenas para amostras com resultado negativo, assim como a prova oficial. Aguarda-se 5 minutos para realização da leitura. Como resultado positivo ocorre o desenvolvimento de um halo de coloração salmão (Figura 3), indicando leite cru ou propriamente pasteurizado, mas se a enzima peroxidase estiver ausente, o leite mantém sua coloração normal, indicando leite superaquecido, fervido ou leite UHT (BRASIL, 2012). De acordo com a IN n° 62 de 2011 do MAPA, para leite pasteurizado a peroxidase deve ser positiva, e para leite UHT a peroxidase deve ser negativa (BRASIL, 2011a).



FIGURA 3. Resultado positivo para Peroxidase (Fonte: Arquivo pessoal).

3.1.4. Prova do alizarol

Esta prova é realizada com a finalidade de avaliar a resistência ou a estabilidade térmica do leite, afim de verificar se o leite suporta o processo de pasteurização. A causa mais frequente de instabilidade do leite é a acidez produzida por micro-organismos, no entanto, as proteínas podem ter sua estabilidade alterada por outros fatores, como o aquecimento, a quantidade de cálcio, magnésio, fósforo, citrato, ou quantidade de células somáticas, podendo coagular ou precipitar o leite quando estes fatores se alteram demais (BELOTI, 2015). Assim, se as proteínas já

estiverem estressadas devido a uma alta acidez, quando o leite for submetido a uma temperatura de pasteurização ele pode coagular, sendo um grande transtorno dentro de uma indústria.

Para a realização da prova do alizarol, são misturados 2 ml de leite fluído e 2 ml da solução de alizarol, em um tubo de ensaio. A solução de alizarol contém álcool 72% e alizarina, o álcool promove a desestabilização das micelas do leite, levando a coagulação em caso de acidez elevada ou desequilíbrio salino, já a alizarina é um indicador colorimétrico de pH, que irá auxiliar na diferenciação do desequilíbrio salino e da acidez excessiva (BELOTI, 2015). Deve-se realizar agitação do tubo de ensaio e observar a coloração e o aspecto. Leite com boa resistência: coloração vermelho tijolo e as paredes do tubo de ensaio sem grumos ou com uma ligeira precipitação, já o leite ácido: é coagulado, passando para uma tonalidade entre o marrom claro e amarelo (Figura 4). Na acidez elevada ou no colostro, a coloração é amarela, com coagulação forte, e no leite com reação alcalina, e sem coagulação, com coloração lilás a violeta, pode indicar mastites ou presença de neutralizantes.

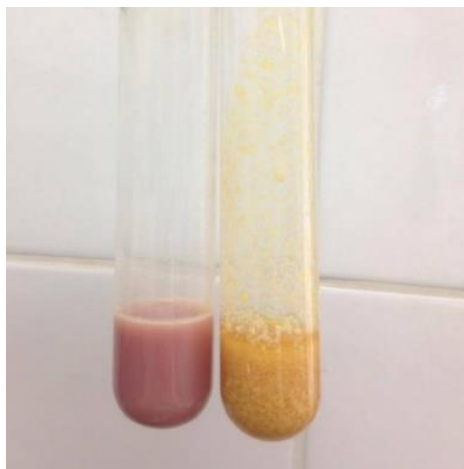


FIGURA 4. Leitura da Prova de Alizarol (Fonte: Arquivo pessoal).

3.1.5. Titulação da acidez pelo método Dornic

O método de Dornic quantifica a acidez do leite provocada principalmente pelo ácido láctico, que é a acidez de origem microbiana, também chamada de acidez adquirida. Quando o leite é obtido em condições inadequadas de higiene ou refrigeração deficiente, a acidez aumenta, podendo tornar o leite impróprio para o consumo humano. A causa mais frequente de acidez é a produção de ácido láctico pelas bactérias que degradam a lactose, mas também pode ser devido a mistura de

colostro em leite fluído, que se caracteriza por ser bastante ácido, ou animais com acidez metabólica, onde o gás carbônico é eliminado em maiores quantidades no leite, provocando acidez (BELOTI, 2015).

Pipeta-se 10 ml de leite em béquer ou tubo de ensaio e adicionam-se 5 gotas de fenolftaleína a 1% que é um indicador incolor, que em pH básico, torna-se rosa. Em seguida titula-se a solução Dornic através de bureta graduada, até a viragem de cor do indicador para rosa persistente por aproximadamente 30 segundos (Figura 5). Verifica-se então o volume de solução Dornic utilizado, sendo que cada 0,1 ml gastos corresponde a 1°D. De acordo com a IN 62 de 2011 a acidez normal do leite está entre 14 e 18 graus Dornic (BRASIL, 2011a).



FIGURA 5. Titulação da acidez pelo método Dornic (Fonte: Arquivo pessoal).

3.1.6. Determinação da Densidade relativa

A determinação da densidade do leite fluído é realizada utilizando o termolactodensímetro, que permite verificar a densidade e a temperatura ao mesmo tempo. É determinada pela fórmula $D=m/v$ (resultado da massa sobre o volume), ou seja, a densidade do leite depende diretamente da matéria dissolvida e suspensa no volume pesquisado, isto é, do extrato seco desengordurado, gordura e água (BRASIL, 2013). A determinação da densidade auxilia a detectar fraudes por adição de água, reconstituintes de densidade (como sal, açúcar e farinha), desnate, e na determinação de sólidos totais desengordurados (BELOTI, 2015), por exemplo, um leite desnatado apresentará maior densidade quando comparado a um leite normal, pois a gordura tem peso menor do que a água, o contrário é visto em um leite onde houve a adição de água, onde a densidade será menor do que um leite não fraudado com água.

Completa-se proveta de 500 ml com leite, então mergulha-se o termolactodensímetro limpo e seco na amostra, de modo que flutue sem tocar na

parede da proveta, após estabilização, realiza-se a leitura da escala de densidade e de temperatura do leite (Figura 6). A leitura do termolactodensímetro deve ser realizada com o leite a 15°C, pois a temperatura pode alterar a densidade do leite. Quando a temperatura é maior há uma expansão do volume, permitindo que as substâncias fiquem mais dispersas, diminuindo a densidade, o frio, ao contrário, irá aumentar a densidade pela aproximação das partículas (BELOTI, 2015). Se a temperatura do leite estiver entre 10 e 20°C a determinação da densidade pode ser realizada, mas necessita-se de correção, adiciona-se 0,0002 a densidade para cada grau acima de 15°C, e retira-se 0,0002 para cada grau abaixo de 15°C (BRASIL, 2013). Para correção de temperaturas acima de 20°C e abaixo de 10°C, pode-se utilizar as tabelas de correção, que oferecem maior precisão. Segundo a legislação brasileira, os valores da densidade do leite devem variar entre 1,028 a 1,034 g/ml a 15°C (BRASIL, 2002).



FIGURA 6. Determinação da densidade com termolactodensímetro (Fonte: Arquivo pessoal).

3.1.7. Determinação da Gordura

A gordura está presente no leite sob a forma de emulsão, pequenos glóbulos de gordura suspensos em água. A determinação da gordura presente no leite é feita pelo Método de Gerber, usando o butirômetro de Gerber. O princípio do método de Gerber baseia-se na quebra da emulsão do leite com ácido sulfúrico concentrado e na utilização do álcool amílico, uma substância desmulsificante. O ácido sulfúrico digere as proteínas que se encontram ligadas à gordura, diminuindo a viscosidade do

meio, aumentando a densidade da fase aquosa e fundindo a gordura, a liberação do calor proveniente da reação favorece a separação da gordura pela ação do álcool isoamílico, que faz a separação da fase de gordura da fase não gordurosa, formando uma coluna límpida (BRASIL, 2014a).

Adiciona-se 10 ml de ácido sulfúrico em butirômetro de Gerber, 11 ml da amostra de leite homogeneizada, e 1 ml de álcool isoamílico e coloca-se a rolha no butirômetro. A reação libera calor, deve-se então segurar o butirômetro com o auxílio de toalha ou luva apropriada. Após homogeneização da mistura, centrifuga-se a mistura em centrífuga de Gerber (1000 a 1200 rpm) por 5 minutos, então transfere-se para banho-maria a 65°C por 5 minutos e repete-se as operações de centrifugação e de incubação. A porcentagem de gordura é lida diretamente na escala do aparelho, na base do menisco formado pela camada de gordura, imediatamente após retirar o aparelho do banho-maria (Figura 7). O leite cru, tem um teor mínimo original de 3,0% de gordura, assim como leite pasteurizado, padronizado e UHT integral. Já os leites semidesnatados, pasteurizado e UHT, devem ter 0,6 a 2,9% de gordura, e o leite UHT ou pasteurizado desnatado, deve ter no máximo 0,5% de gordura (BRASIL, 2011a).



FIGURA 7. Determinação da gordura em Butirômetro de Gerber (Fonte: Arquivo pessoal).

3.1.8. Sólidos Totais (ST) ou Extrato Seco Total (EST)

O extrato seco ou matéria seca é o conjunto de todos os componentes do leite, com exceção da água. Determina-se os valores de EST das amostras através da fórmula: $ST = G/5 + D/4 + G + 0,26$.

Sendo G: Gordura e D: Densidade.

3.1.9. Sólidos Não Gordurosos (SNG) ou Extrato Seco Desengordurado (ESD)

O extrato seco desengordurado representa o teor de sólidos totais do leite subtraído da gordura, sendo seu valor obtido pela subtração da porcentagem de extrato seco total, da porcentagem de gordura da amostra (BRASIL, 2006a): SNG: Extrato Seco Total – Gordura. O parâmetro de normalidade é de no mínimo 8,4% (BRASIL, 2011a).

3.2. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Os micro-organismos tem grande importância para toda a cadeia do leite, seja nos processos desejáveis, como na fabricação de alimentos fermentados, ou nos processos inconvenientes, como deterioração microbiana ou ainda apresentando riscos à saúde do consumidor, sendo o caso dos micro-organismos patogênicos (FRANCO & LANDGRAF, 2008; BELOTI, 2015).

O leite é um alimento propício para o crescimento de praticamente todos os gêneros de micro-organismos aeróbios. Tanto os termófilos, mesófilos e psicrótrófos possuem grande importância na cadeia leiteira, os primeiros por resistirem à pasteurização, já que são micro-organismos que se desenvolvem em temperaturas acima de 45°C, os mesófilos porque se desenvolvem em temperatura ambiente, e os psicrótrófos porque se desenvolvem na temperatura de refrigeração (BELOTI, 2015).

A pesquisa de todos os patógenos e micro-organismos indesejáveis no leite é inviável economicamente e tecnicamente, por isso, o controle microbiológico em amostras de leite é realizado através da pesquisa de microrganismos indicadores, principalmente os aeróbios mesófilos e os coliformes. Durante o período de estágio tive a oportunidade de acompanhar as análises microbiológicas que são realizadas na rotina do LIPOA, como contagem de mesófilos, NMP de coliformes totais e termotolerantes e pesquisa de *Salmonella* spp. em leites e derivados lácteos.

3.2.1. Diluição de amostras

De acordo com o método oficial descrito pela IN nº 62 de 2003 para a pesagem e preparo de amostras, primeiramente deve-se realizar a assepsia da embalagem com álcool 70%. Para produtos sólidos, com o auxílio de pinças e facas estéreis, pesa-se $25 \pm 0,2$ g da amostra, e adiciona-se 225 ml de solução salina peptonada 0,1% e homogeneiza-se por 60 segundos em stomacher, sendo esta a diluição 10^{-1} . Para produtos líquidos, a diluição 10^{-1} é obtida transferindo 1 ml da amostra para tubo contendo 9 ml de solução salina peptonada 0,1%, e homogeneiza-se a mistura em agitador de tubos vortex, e a partir da 10^{-1} , prepara-se as demais diluições, transferindo 1 ml da diluição 10^{-1} para tubo contendo 9 ml de solução salina peptonada 0,1%, tendo então a 10^{-2} e assim por diante, até se obter o número de diluições desejadas (BRASIL, 2003).

3.2.2. Mesófilos

A enumeração dos aeróbios mesófilos é o principal parâmetro de qualidade e higiene para o leite cru e pasteurizado, altas contagens desses micro-organismos indicam as más condições de produção, armazenamento e processamento do leite, além disso, também podem indicar a presença de patógenos, já que a maioria das bactérias patogênicas de origem alimentar são mesófilas (BELOTI, 2015).

Para realização da análise de mesófilos, realiza-se o procedimento de pesagem e diluição da amostra (conforme item 3.2.1 deste relatório) e semeia-se 1 ml da diluição desejada, em placa de Petri estéril, então adiciona-se cerca de 15 a 20 ml de PCA fundido e mantido em banho-maria a 46-48°C. O PCA não contém nenhum inibidor ou indicador, é usado principalmente para determinar o número total de micro-organismos principalmente em leite, derivados lácteos e água. Homogeneiza-se adequadamente o ágar com o inóculo a partir de movimentos leves realizados com a placa, e deixa-se em superfície plana para que o ágar possa solidificar, e então incubam-se as placas invertidas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas. Para a leitura conta-se todas as colônias presentes na placa, utilizando como critério para contagem: placas que contenham entre 25 e 250 colônias, o resultado é expresso em UFC/g ou ml, para se obter o resultado multiplica-se o número de colônias contadas pelo inverso da diluição (BRASIL, 2003).

3.2.3. *Salmonella* sp.

Salmonella sp. é um importante patógeno amplamente distribuído pelo mundo, associado aos produtos de origem animal como um dos principais agentes de enfermidades causadas pela ingestão de alimentos. O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae e compreende pequenos bacilos gram-negativos, não produtores de esporos e anaeróbios facultativos (JAY, 2005; FRANCO & LANDGRAF, 2008), onde a maioria é móvel, através de flagelos peritríquios, exceção feita à *S. pullorum* e à *S. gallinarum*, que são imóveis (SILVA et al., 2010). O pH ótimo de multiplicação fica próximo de 7,0 e a temperatura ideal é 35-37°C, sendo a mínima de 5°C e a máxima de 47°C (BELL & KYRIAKIDES, 2002).

O principal habitat dos micro-organismos pertencentes ao gênero *Salmonella* é o trato intestinal de humanos e animais, e tipicamente provocam gastroenterites sem complicações (WHO, 2013), mas em crianças, idosos e indivíduos com o sistema imunológico debilitado ou comprometido, essas infecções podem ser severas, causando complicações mais graves (BELOTI, 2015). A toxinfecção alimentar é causada pela ingestão de alimentos que contenham números significativos de espécies ou sorovares não-hospedeiros-específicos do gênero *Salmonella* e os sintomas surgem em torno de 12 a 14 horas após a ingestão do alimento contaminado (JAY, 2005), e incluem diarreia, febre, dores abdominais e vômito, durando em média entre dois a sete dias, podem estar acompanhados por fraqueza, fadiga muscular, nervosismo e sonolência (WHO, 2013).

Além das salmoneloses, outras doenças também são causadas por *Salmonella*, como a febre tifóide, causada por *Salmonella typhi* e as febres entéricas, causadas por *Salmonella paratyphi* (FRANCO & LANDGRAF, 2008). Dentre os principais alimentos associados à essas doenças, incluem-se vegetais crus, mariscos e principalmente alimentos de origem animal como carne bovina, carne de aves, ovos, leite cru e queijos (WHO, 2013; FRANCO & LANDGRAF, 2008; BELOTI, 2015).

A técnica tradicional utilizada para detecção de *Salmonella* em alimentos é o método de presença ou ausência de *Salmonella* em 25g de alimento, realizado com base na IN n° 62 (BRASIL, 2003), o qual segue basicamente quatro etapas: pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, plaqueamento seletivo diferencial e confirmação.

Pré-enriquecimento em caldo não seletivo: Tem como objetivo a recuperação das células injuriadas, diluindo 25 ml da amostra (amostras líquidas como leite) ou 25g da amostra (no caso de amostras sólidas como queijo), em 225 ml de Água peptonada tamponada 1%, com incubação por 19 horas a $36^{\circ}\text{C} \pm 1$. O APT é um meio de pré-enriquecimento, que fornece condições para a reanimação de células injuriadas.

Enriquecimento em caldo seletivo: Tem como objetivo inibir a multiplicação da microbiota acompanhante e promover a elevação preferencial do número de células de *Salmonella*. Utiliza-se dois meios de enriquecimento diferentes, devido à variação de resistência das diferentes cepas de *Salmonella* aos agentes seletivos (BRASIL, 2011c). Para esta segunda etapa da análise, eram obrigatoriamente utilizados o Caldo Rappaport Vassiliadis Soja e o Caldo Selenito. Assim, transferia-se uma alíquota de 50 µl do caldo não seletivo APT inoculado, para 5 ml do Caldo RVS e 500µl, para 5 ml do Caldo Selenito, incubando a 41°C por 26 horas em banho-maria.

Plaqueamento seletivo diferencial: Tem como objetivo promover o desenvolvimento preferencial de colônias de *Salmonella*, com características macroscópicas típicas que as distingam dos competidores, para então realizar a confirmação sorológica ou bioquímica. Assim como na etapa de enriquecimento seletivo, recomenda-se que o plaqueamento diferencial seja feito em mais de um tipo de meio de cultura, os meios utilizados no LIPOA são Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) que diferencia a *Salmonella* de bactérias não patogênicas através da fermentação da xilose, descarboxilação da lisina, alterando o pH do meio para alcalino, além disso, o meio contém desoxicolato de sódio para inibir coliformes (BRASIL, 2011c) e Ágar Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose (BPLS), que apresenta em sua composição bile bovina e um corante derivado do trifenilmetano (verde brilhante), responsáveis pela inibição de microrganismos Gram-positivos, indicado para isolamento de *Salmonella* spp., exceto *S. typhi* e *Shigella* spp. (BRASIL, 2003).

Com o auxílio de alça bacteriológica de metal previamente flambadas, transfere-se uma pequena alíquota dos meios enriquecidos seletivos Caldo RVS e Caldo Selenito, e realiza-se estrias de esgotamento superficial em placas contendo os ágaros XLD (Figura 8) e BPLS (Figura 9), então incuba-se as placas a 35°C por 22 horas. Após o período de incubação, a observação de colônias típicas de *Salmonella*

era um indicativo de resultado positivo, ou seja presença de *Salmonella* em 25 g/ml de leite ou derivados.

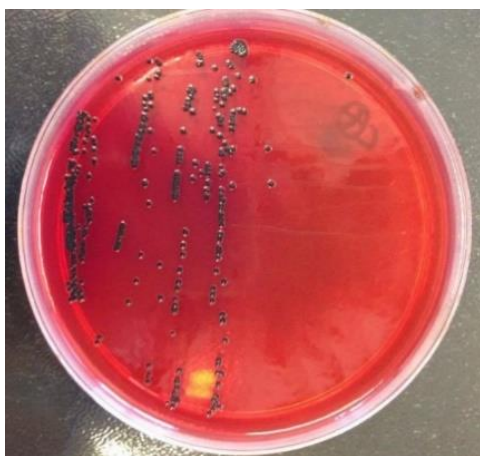


Figura 8. Placa de XLD com colônias típicas de *Salmonella* (Fonte: Arquivo pessoal).

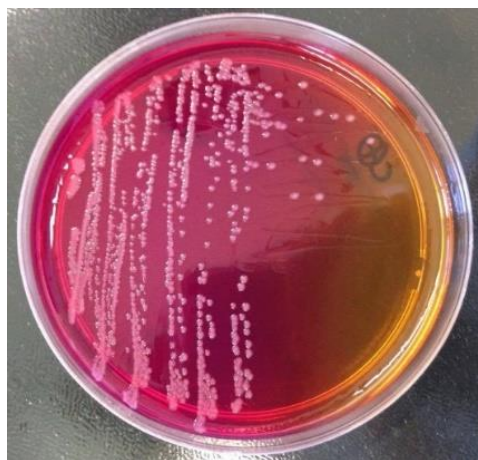


Figura 9. Placa de BPLS com colônias típicas de *Salmonella* (Fonte: Arquivo pessoal).

Confirmação: Tem como objetivo verificar se as colônias típicas obtidas nas placas são de fato colônias de *Salmonella*, sendo realizada no LIPOA por PCR, mas durante o período de realização do estágio, nenhuma amostra de leite ou derivado foi positiva para *Salmonella*, não sendo possível acompanhar o método de confirmação. A referência para a análise de *Salmonella* é ausência de *Salmonella* em 25g ou ml de amostra (BRASIL, 2001).

3.2.4. NMP de Coliformes a 35°C e a 45°C

O grupo de bactérias chamadas de coliformes a 35°C ou coliformes totais são micro-organismos capazes de fermentar a lactose com produção de ácido e gás quando incubados a 32/35°C em 48 horas. Dentro desse grupo se encontram bactérias que habitam normalmente o trato gastrointestinal de animais de sangue quente, como *Escherichia coli*, assim como bactérias não entéricas como *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Serratia* (SILVA et al., 2010). Estão presentes em grandes quantidades no ambiente, e são excelente indicadores para alimentos pasteurizados, pois são sensíveis à temperaturas altas e devem ser eliminados por tratamento térmico como pasteurização e UHT, ou seja, sua presença em leite pasteurizado

significa que os tratamentos não atingiram a temperatura correta, ou que houve recontaminação após a pasteurização (BELOTI, 2015).

Já os coliformes a 45°C ou termotolerantes, são um subgrupo dos coliformes totais, restrito aos membros capazes de continuar a fermentar a lactose quando incubados a 44,5 a 45,5°C por 48 horas, com produção de gás (FRANCO & LANDGRAF, 2008). O grupo inclui enterobactérias originárias do trato gastrointestinal, como *Escherichia coli*, e membros de origem não fecal, incluindo *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* e *Citrobacter freundii* (SILVA et al., 2010). Esse grupo é aceito como indicativo da possibilidade de contaminação fecal, além de indicarem falha no processo ou contaminação pós processamento em alimentos pasteurizados, pois são facilmente destruídos pelo calor (SILVA et al., 2010).

A análise de coliformes totais e termotolerantes é realizada seguindo a IN nº 62 de 2003 (BRASIL, 2003). Primeiramente realiza-se o preparo e diluição da amostra (conforme item 3.2.1 deste relatório), para alimentos sólidos ou pastosos, dilui-se a amostra até a 10^{-3} , e para alimentos líquidos, utiliza-se a amostra integral e a partir da amostra integral são obtidas as diluições 10^{-1} e 10^{-2} . O LIPOA utiliza o método de NMP em série de três tubos para determinação de coliformes a 35°C e a 45°C.

Primeiramente é realizado o teste presuntivo, onde três alíquotas de 1 ml, de três diluições da amostra, são inoculadas em uma série de três tubos contendo 9 ml de Caldo Lauril Sulfato Tryptose (LST) concentração simples, com um tubo de Durhan. Após inoculação incuba-se os tubos por 24-48 horas a 35°C. O LST contém lactose e a observação de crescimento com formação de gás (mínimo 1/10 do volume total do tubo de Durhan) a partir da fermentação da lactose, é considerada suspeita (presuntiva) para a presença de coliformes (Figura 10).

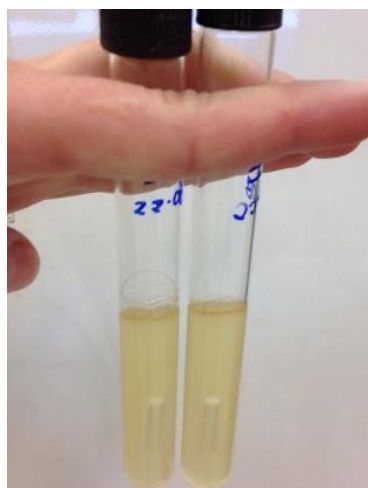


FIGURA 10. Tubo contendo caldo LST positivo (Fonte: Arquivo pessoal).

Para confirmação dos coliformes totais inocula-se uma alíquota de 500 µl do tubo contendo LST que foi positivo na prova presuntiva, para um tubo contendo 4,5 ml de Caldo Verde Brilhante Bile Lactose 2% (VBBL) e tubo de Durhan, com posterior incubação a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ de 24-48 horas. A presença de gás nos tubos de Durhan (mínimo 1/10 do volume total do tubo de Durhan) evidencia a fermentação da lactose presente no meio (Figura 11) e a seletividade do meio que inibe o crescimento de micro-organismos gram-positivos se dá através de bile bovina e um corante derivado do trifenilmetano (verde brilhante) (BRASIL, 2003).

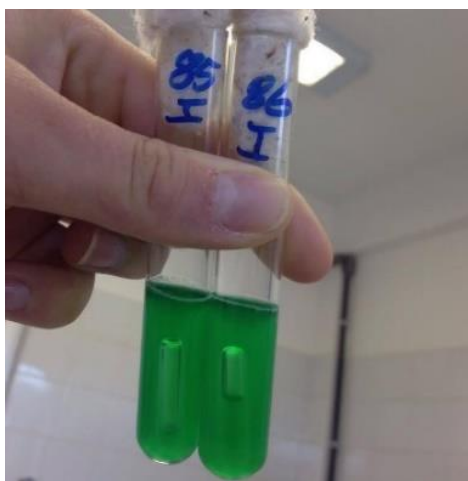


FIGURA 11. Tubos contendo Caldo VBBL positivos para coliformes totais (Fonte: Arquivo pessoal).

Para a confirmação da presença de coliformes termotolerantes inocula-se uma alíquota de 50 µl da amostra que foi positiva na prova presuntiva do LST em 4 ml de Caldo *E. coli* (EC), e então incuba-se em temperatura seletiva de $45 \pm 0,2^\circ\text{C}$, em banho-maria. A lactose presente no meio será fermentada pelos coliformes formando gás nos tubos de Durhan, sendo confirmada a presença de coliformes termotolerantes (Figura 12). O Caldo EC apresenta em sua composição uma mistura de fosfatos que lhe confere um poder tamponante impedindo a sua acidificação e a seletividade do meio é devido a presença de sais biliares que são responsáveis pela inibição do crescimento de micro-organismos gram-positivos (BRASIL, 2003). Os tubos de EC positivos para coliformes termotolerantes são indicativos da presença de *E. coli* mas não são realizados testes confirmatórios para *E. coli* no LIPOA.

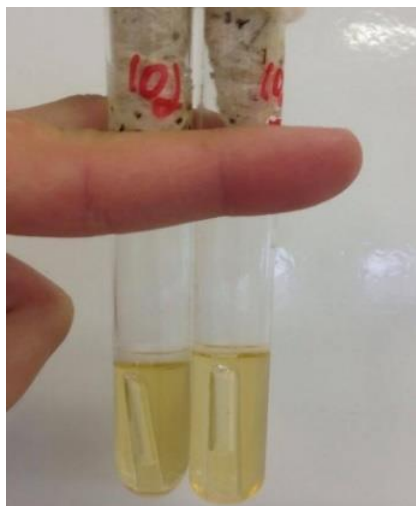


FIGURA 12. Tubo contendo Caldo EC positivo para coliformes termotolerantes (Fonte: Arquivo pessoal).

Para verificação do Número Mais Provável de coliformes, no momento da leitura das provas confirmatórias em Caldo EC e Caldo VBBL, deve-se anotar o número de tubos positivos em cada série de diluições, para então realizar a leitura em tabela padrão de NMP para séries de 3 tubos. De acordo com a IN n° 62 de 2011 a enumeração de coliformes a 30/35°C deve ser menor que 4 NMP/ml por amostra de leite pasteurizado, e para coliformes a 45°C, o máximo é de 2 NMP/ml por amostra de leite pasteurizado (BRASIL, 2011a), e os valores de referência para coliformes a 45°C segundo a RDC 12 de 2001 da ANVISA, que é o valor de referência seguido no LIPOA, é de no máximo 4 NMP/ml para amostras de leite pasteurizado (BRASIL, 2001).

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – “JULIO DE MESQUITA FILHO”
- BOTUCATU**

4. DESCRIÇÃO DO LOCAL DO ESTÁGIO

Parte do estágio supervisionado obrigatório foi realizado no Serviço de Orientação à Alimentação Pública (SOAP) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus de Botucatu, sob a orientação do Prof. Fabio Sossai Possebon, no período de 22 de Agosto à 22 de Setembro de 2016.

O SOAP ocupa um prédio próximo ao Hospital Veterinário, pertencente ao Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista no Campus de Botucatu. No SOAP realizam-se análises sensoriais, microscópicas, macroscópicas, microbiológicas e físico-químicas de diversos alimentos. Outros serviços também são realizados pelo SOAP, tais como, consultorias, laudos, treinamentos, orientações técnicas solicitadas pelas empresas, indústrias, hospitais, lanchonetes e mercados da região, etc. Além disso, também são realizadas diversas atividades de ensino, pesquisa e extensão (UNESP, 2016).

4.1. ÁREA FÍSICA DO SOAP

O SOAP possui uma sala para recebimento e cadastramento de amostras e atendimento aos clientes. Uma sala de armazenamento de amostras recém chegadas ao laboratório, que permanecem nas geladeiras mantidas sob refrigeração até o momento de realização das análises. Todas as análises microbiológicas são realizadas no laboratório de microbiologia, este laboratório contém sala de preparo de amostras, utilizada para preparar amostras que serão imediatamente analisadas, também conta com uma sala de preparo de meios de cultura, e uma sala de pesagem e semeadura de amostras, que é destinada à realização das análises microbiológicas, como pesagem e diluição das amostras, plaqueamento, repique, etc. O laboratório de microbiologia também possui sala de incubação e leitura, onde as amostras são incubadas e posteriormente lidas. O SOAP conta com um Laboratório de Análises Físico-químicas, composto por uma sala de aparelhos, e uma sala de pesagem. Na

sala de análises físico-químicas são realizadas as análises propriamente ditas, também são armazenados os reagentes químicos, e todo o material que será usado nas análises. O laboratório também conta com uma sala de descarte e lavagem do material utilizado nas análises físico-químicas e microbiológicas, além disso, possui uma sala de esterilização.

Além de todas as salas citadas acima, que são as salas mais utilizadas para a rotina de análises de alimentos do SOAP, o laboratório ainda conta com um refeitório, com uma sala de análises físico-químicas e microbiológicas para a docência, uma sala de apoio a Pós-Graduação, uma sala de apoio técnico para os residentes, uma sala de apoio para os estagiários, uma sala para responsável-técnico, duas salas dos professores, uma sala de reuniões, uma secretaria de atendimento interno, um almoxarifado, e uma sala destinada aos fiscais do MAPA (Figura 13).



FIGURA 13. Serviço de Orientação à Alimentação Pública (Fonte: www.fmvz.unesp.br).

5. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

5.1. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

A maioria dos alimentos analisados no SOAP eram provenientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP Botucatu e de outros hospitais regionais. Dentre os alimentos analisados durante o período do estágio, pode-se citar carne moída ou picada, salada, leite pasteurizado, leite materno e produtos de cesta básica. Houve o acompanhamento das seguintes análises microbiológicas: contagem de mesófilos, NMP de coliformes a 35°C e a 45°C, pesquisa de *Salmonella*, Contagem de *Staphylococcus*, *Bacillus cereus* e *Clostridium* Sulfito Redutor.

As análises de mesófilos, *Salmonella* e de coliformes a 35°C e a 45°C já foram descritas anteriormente neste relatório, nos itens 3.2.2, 3.2.3 e 3.2.4 respectivamente. A técnica para a realização destas análises é muito semelhante em ambos os laboratórios. A principal diferença com relação a contagem de mesófilos é que no LIPOA utiliza-se a técnica de plaqueamento por profundidade em PCA, já no SOAP a contagem de mesófilos é realizada utilizando 3M™ Petrifilm™ AC, que consiste em um sistema de meio de cultura pronto para uso, que contém os nutrientes do método padrão, um agente geleificante e um corante indicador vermelho que dá cor e facilita a enumeração das colônias (3M, 2016).

Primeiramente realiza-se o procedimento de pesagem e diluição da amostra (conforme item 3.2.1), então Inocula-se 1 ml da diluição desejada da amostra no petrifilm e com o auxílio do difusor, distribui-se o inóculo em uma área circular de 20 cm² do petrifilm, então incuba-se o mesmo a 35-37°C por 48 horas. Transcorrido o tempo de incubação, realiza-se a contagem de colônias com coloração vermelha dos petrifilmes que contenham entre 25 e 250 colônias (Figura 14) e então multiplica-se o número de colônias contadas pelo inverso da diluição, e os resultados são expressos em UFC/g ou ml (BRASIL, 2003).

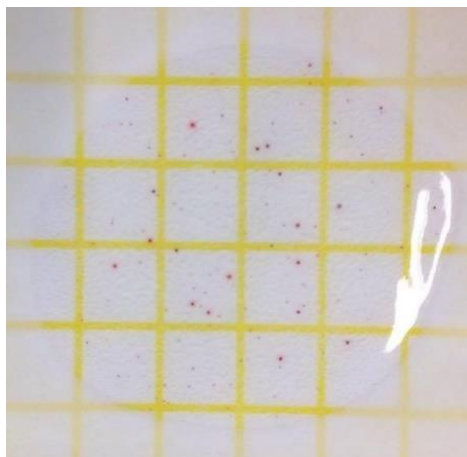


FIGURA 14. Petrifilm com colônias de mesófilos (Fonte: Arquivo pessoal).

Com relação ao NMP de coliformes a 35°C e a 45°C, na prova presuntiva utiliza-se séries de três tubos contendo 9 ml de Caldo LST concentração simples, nestes inocula-se 1 ml da amostra integral e suas diluições e incuba-se por 48 horas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Para a prova confirmatória utiliza-se o Caldo EC e o Caldo VBBL. Com o auxílio de palitos de madeira previamente esterilizados, inocula-se uma pequena quantidade da amostra positiva no Caldo LST em tubo contendo 9 ml de Caldo EC e 9 ml de Caldo VBBL, incuba-se ambos por 48 horas, a 45 e 35°C, respectivamente. Após o período de incubação as amostras que contenham formação de gás em no mínimo 1/10 do tubo de Durham são consideradas positivas e então, anota-se o número de tubos positivos para realizar leitura na tabela padrão de NMP para séries de três tubos.

Para a verificação da presença ou ausência de *Salmonella* em 25 g ou ml de alimento, na primeira etapa da análise que consiste no pré-enriquecimento da amostra, dilui-se 25 g ou ml da amostra em 225 ml de APT, e incuba-se por 18-24 horas a 35°C. No enriquecimento seletivo, utiliza-se o Caldo RVS e o Caldo Tetratonato, acrescido de Solução Iodo-Iodeto. Então inocula-se 0,1 ml da amostra pré-enriquecida em APT, em 9 ml de Caldo RVS e 1 ml da amostra em 9 ml do Caldo Tetratonato, incubando a 35 a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação, realiza-se o plaqueamento seletivo diferencial, estriando as amostras contidas no caldo RVS e no caldo Tetratonato em Ágar XLD e Ágar Bismuto Sulfito (BS). O Ágar BS é um meio de cultivo indicado para o isolamento e diferenciação de *Salmonella* spp., particularmente *Salmonella typhi*. Se baseia na produção de H_2S e redução do bismuto, e na não fermentação da lactose, e tem como inibidores o verde brilhante e o sulfito de bismuto (BRASIL,

2011c). Na caracterização das colônias, as colônias de *S. Typhi* serão negras circundadas por halo de brilho metálico e para os outros sorovares de *Salmonella* as colônias serão enegrecidas ou esverdeadas (BRASIL, 2011c). Depois de se realizar as estrias de esgotamento, as placas são incubadas a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação, as placas que contenham colônias típicas de *Salmonella*, seguem para os testes bioquímicos Ágar Lisina Ferro (LIA) Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI), e então para o teste confirmatório de soro aglutinação, tais análises não foram acompanhadas durante o período de estágio pois nenhuma amostra foi positiva para *Salmonella*.

5.1.1. *Staphylococcus* sp.

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos gram-positivos, pertencentes à família *Micrococcaceae*, facultativamente anaeróbios, com maior crescimento sob condições aeróbias (BELOTI, 2015). A espécie *S. aureus* é a mais frequentemente associada às doenças estafilocócicas, sendo responsável por 98% dos surtos de gastroenterites estafilocócicas (BELOTI, 2015). A temperatura ótima de crescimento do *S. aureus* é de 35 a 40°C, sendo facilmente destruído na pasteurização ou na cocção de alimentos (SILVA et al., 2010; JAY, 2005). Já as enterotoxinas são termoestáveis, podendo resistir por 6 minutos a 126,7°C, ou seja, continuam ativas mesmo após tratamentos térmicos severos, como o tratamento UHT e a esterilização de alimentos (BELOTI, 2015; SILVA et al., 2010).

São incluídos nos alimentos através dos manipuladores, visto que o principal reservatório de *S. aureus* são os seres humanos e os animais de sangue quente, ocorrendo nas vias nasais, garganta, pele e cabelos, de 50% ou mais indivíduos saudáveis (ICMSF, 1996). De modo geral, estão presentes em quase todos os alimentos de origem animal ou não, como presuntos, queijos, ovos, saladas, atum, frango, batata, etc. (JAY, 2005; SILVA et al., 2010). Para causar sintomatologia precisam atingir populações maiores que 10^6 UFC/ml ou g de alimento, para que produzam quantidades suficientes de enterotoxinas (100ng) (BELOTI, 2015). Os sintomas ocorrem entre 2 a 6 horas após a ingestão de um alimento contaminado, e incluem náuseas, vômitos, cólicas, prostração, dores de cabeça, pressão baixa e queda de temperatura (SILVA et al., 2010; BELOTI, 2015; ICMSF, 1996), geralmente tem duração de 24 a 48 horas, e as complicações ou mortes são baixas (JAY, 2005).

Para a enumeração das colônias de *Staphylococcus sp.* o meio de cultura Baird-Parker (BP) é o método de escolha (ICMSF, 1996), pois combina o telurito de potássio, a glicina e o cloreto de lítio como agentes seletivos, e como caracterização diferencial, a redução do telurito de potássio (produzindo colônias pretas) e a hidrólise da gema de ovo. O ágar BP suplementado com solução de gema de ovo possibilita a verificação das atividades proteolítica e lipolítica do *S. aureus*, por meio do aparecimento de um halo de transparência e um de precipitação ao redor da colônia (BRASIL, 2003).

A análise é realizada conforme a IN nº 62 de 2003, realizando a técnica de semeadura superficial. Primeiramente realiza-se o procedimento de pesagem e diluição da amostra (conforme item 3. 2.1 deste relatório), e então inocula-se 0,1 ml da diluição 10^{-1} na superfície da placa contendo Ágar BP previamente preparado e seco. Com o auxílio de uma alça de Drigalski, espalha-se o inóculo por toda a superfície da placa até que seja totalmente absorvido. Então incuba-se as placas invertidas, a 35-37°C por 48 horas. Realiza-se a contagem de placas com 20 a 200 colônias típicas (SILVA et al., 2010). As colônias típicas de *S. aureus* em Ágar BP são pretas ou cinza escuras, lisas, convexas, com bordas perfeitas, rodeadas por um halo transparente e um halo de precipitação, indicando atividade proteolítica e lipolítica, respectivamente (BRASIL, 2003).

O Ágar BP não é capaz de suprimir completamente o crescimento de competidores de *S. aureus*, e outras espécies não patogênicas do gênero *Staphylococcus* podem crescer no meio, produzindo colônias semelhantes, havendo a necessidade de submeter as colônias típicas ao teste de coagulase, para confirmação de *S. aureus*, que é coagulase positiva (SILVA et al., 2010). Durante o período de estágio nenhuma amostra teve colônias típicas no Ágar BP, não sendo possível acompanhar o teste da coagulase.

5.1.2. *Bacillus cereus*

Bacillus cereus é um bacilo Gram-positivo, aeróbio, mesófilo, com flagelos peritríquios, produtor de esporos e produtor de toxinas, chamadas de toxina entérica e toxina emética, e pode produzi-las simultaneamente ou não (FRANCO & LANDGRAF, 2008; BELOTI, 2015). É normalmente encontrado no solo, na poeira, na água, e pode ser encontrado em diversos alimentos, principalmente vegetais, cereais

e condimentos (JAY, 2005). Dentre eles, destaca-se o arroz, que tem sido o alimento mais frequentemente envolvido em surtos de origem alimentar (FRANCO & LANDGRAF, 2008). *B. cereus* também pode ser encontrado em produtos de origem animal como carne bovina, suína e de frango, produtos lácteos (queijos e sorvetes), e seus esporos são comumente encontrados em leite em pó (BELOTI, 2015).

A temperatura ótima de crescimento é de 30 a 40°C, mínima de 4°C e máxima de 55°C (JAY, 2005). Uma característica importante do *B. cereus* é a produção da toxina emética, que suporta tratamentos térmicos severos, como 126°C por 90 minutos (ICMSF, 1996) e é responsável pela síndrome emética. Esta síndrome se caracteriza por vômitos, náuseas e mal-estar, e em alguns casos, pode haver diarreia. O período de incubação é curto, entre 1 a 6 horas, e a recuperação do paciente ocorre entre 12 a 24 horas (ICMSF, 1996). Já a síndrome diarreica é provocada pela toxina entérica, que é termosensível, sendo inativada por aquecimento a 56°C por 5 minutos (SILVA et al., 2010). É caracterizada por dores abdominais, diarreia intensa e tenesmos retais, raramente ocorrem náuseas e vômitos, com período de incubação de 8 a 16 horas e sintomatologia entre 12 e 14 horas (SILVA et al., 2010).

Primeiramente realiza-se o procedimento de pesagem e diluição da amostra (conforme item 3. 2.1), e por plaqueamento direto inocula-se 0,1 ml da diluição 10^{-1} da amostra, em placa de Petri estéril contendo Ágar *Bacillus cereus* (BC). Com o auxílio de uma alça de Drigalski espalha-se o inóculo por toda a superfície da placa até que seja totalmente absorvido, então incuba-se na temperatura de 30°C por 48 horas, para posterior leitura da placa. O Ágar BC deve ser suplementado com polimixina B que é um agente seletivo para *B. cereus*, e com gema de ovo que fornece lecitina ao meio, e além disso, o meio contém azul de bromotimol que é um indicador de pH, para detectar a utilização de manitol. O *B. cereus* é tipicamente manitol-negativo (formando colônias azuis) e lecitinase positivo, ou seja, produz lecitinase que hidrolisa a lecitina presente no meio, formando uma zona de precipitação ao redor das colônias (OXOID, 2016). Durante o período de estágio, nenhuma amostra foi positiva para *Bacillus cereus*, não sendo possível visualizar a morfologia das colônias positivas neste ágar.

5.1.3. Clostrídios Sulfito Redutores a 46°C

Os clostrídios sulfito redutores, são os clostrídios capazes de reduzir o sulfito a sulfeto de hidrogênio (H_2S) a 46°C. Sua aplicação na análise de alimentos é indicar

de forma simples e rápida a potencial presença de *C. perfringens*, que é sulfito redutor, e se multiplica a temperatura de 46°C. As cepas de *C. perfringens* são bastonetes Gram-positivos, anaeróbios estritos, imóveis, e esporogênicos (ICMSF, 1996). O *C. perfringens* é mesófilo, com temperatura ótima de crescimento entre 37°C e 45°C, sendo capaz de crescer ativamente em altas temperaturas, com máxima em torno de 50°C (JAY, 2005), mas sendo muito sensíveis em temperaturas menores, sendo 12 e 15°C as temperaturas mínimas de crescimento já relatadas (SILVA et al, 2010).

As cepas da espécie são classificadas em A, B, C, D e E, com base na capacidade de produzir as quatro toxinas mais letais (alfa, beta, épsilon e iota) (FRANCO & LANDGRAF, 2008). Os tipos A, C e D são patogênicos para humanos e produzem enterotoxina, responsável pela forma clássica da toxinfecção alimentar, geralmente associada a cepas do tipo A (ICMSF, 1996). A toxinfecção ocorrerá pela ingestão de alimentos contendo elevado número de células viáveis de *C. perfringens* (10^6 a 10^7), que esporulam no intestino delgado e liberam a enterotoxina durante a esporulação, sendo necessárias grandes quantidades da toxina (8 a 10 mg) (FRANCO & LANDGRAF, 2008). A sintomatologia ocorre entre 8 a 15 horas após a ingestão do alimento contaminado, e se caracteriza por ser branda e comum, e os principais sintomas incluem intensas dores abdominais, gases, diarreia, raramente náuseas e vômitos (ICMSF, 1996).

Primeiramente realiza-se o procedimento de pesagem e diluição da amostra (conforme item 3.2.1 deste relatório), e então inocula-se 1 ml da diluição 10^{-1} da amostra, em placa de Petri estéril, e pela técnica de plaqueamento em profundidade, adiciona-se de 15 a 20 ml de Ágar Sulfito Polimixina Sulfadiazina, meio específico usado para detecção de *Clostridium* Sulfito Redutores. Após semeadura e secagem do meio, acrescenta-se à placa uma sobrecama do meio de cultura, para o favorecimento da anaerobiose. Então incuba-se as placas a 46°C por 48 horas em jarra de anaerobiose. Após a incubação, conta-se as colônias típicas de *Clostridium* sulfito redutores, que serão enegrecidas devido a redução do sulfito, mas durante o período de estágio, nenhuma amostra foi positiva para a análise, portanto não houve a observação das colônias típicas.

5.2. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Durante o período de realização do estágio acompanhou-se inúmeras análises físico-químicas de diferentes alimentos, como mel, carnes, leite hospitalar, leite materno, água, e alimentos de cesta básica. As metodologias das análises físico-químicas utilizadas no SOAP e descritas neste relatório, seguem as recomendações do livro Métodos físico-químicos para análise de alimentos, do Instituto Adolfo Lutz (LUTZ, 2008).

5.2.1. Mel

O mel é um alimento produzido pelas abelhas melíferas, a partir do néctar das flores, das secreções das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas, que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam madurar nos favos da colmeia (BRASIL, 2000). Com relação aos requisitos do mel, a IN nº 11 de 2000, através do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do mel, traz que o mesmo não poderá ser adicionado de açúcares, aditivos, ou qualquer outra substância que altere a composição original do mel, caracterizando fraude (BRASIL, 2000). Neste contexto, a realização das análises físico-químicas do mel assumem grande importância, visto que o conjunto dessas análises nos permite identificar as possíveis fraudes em mel adulterado, e avaliar se o mesmo está impróprio para consumo. Acompanhou-se a análise do teor de umidade do mel, determinação da acidez, pesquisa de Diastase, reação de Fiehe, determinação de Hidroximetilfurfural e a prova de Lund.

5.2.1.1. Umidade

A determinação da umidade do mel é realizada por refratometria, com o uso do Refratômetro de Abbé. Esta análise é realizada de maneira indireta através do índice de refração da amostra de mel a 20°C, o qual será convertido em porcentagem de umidade, através da tabela de Chataway (LUTZ, 2008). O teor de umidade do mel é um dos parâmetros mais importantes a ser analisado, já que altos teores de umidade podem afetar a qualidade do mel e, conseqüentemente, o seu prazo de validade, além de influenciar na viscosidade, peso, maturidade, cristalização, sabor, conservação e

palatabilidade, e indiretamente na fermentação, pela atuação de micro-organismos osmofílicos (MENDES et al., 2009). Altos teores de umidade podem ser sugestivos de adição de água no mel, coleta de mel verde, ou seja, favos que não estão completamente operculados, ou então, processamento em salas que a umidade relativa do ar seja alta, já que o mel é um alimento muito higroscópico.

Primeiramente calibra-se o refratômetro de Abbé de acordo com a temperatura ambiente, essa calibração é realizada pingando uma gota de água destilada no prisma do aparelho. Após calibração, com o auxílio de um bastão de vidro, coloca-se uma gota de mel no prisma do refratômetro, e realiza-se a leitura da análise, anotando o índice de refração, e a temperatura ambiente da sala, sendo a interpretação, realizada conforme tabela de Chataway. A tabela fornece a porcentagem de umidade, conforme o índice de refração a 20°C. Por isso, é recomendável que a leitura de refração seja feita a 20°C, mas caso seja feita em temperatura diferente, deve-se realizar a correção do índice de refração, ou seja, para temperaturas superiores a 20°C, acrescenta-se 0,00023 a cada grau Celsius de diferença, em caso de temperaturas inferiores a 20°C, subtrai-se 0,00023 para cada grau Celsius de diferença (LUTZ, 2008). De acordo com a instrução normativa nº 11 de 2000, o limite máximo de umidade do mel é de 20%, ou seja, 20g de umidade/100g de mel analisado, sendo que o ideal, é um teor de 17 a 18% (BRASIL, 2000).

5.2.1.2. Determinação da Acidez

A origem da acidez do mel, deve-se a variação dos ácidos orgânicos, causada pelas diferentes fontes de néctar, pela ação da enzima glicose-oxidase sobre a glicose, que origina o ácido glucônico. Também pela ação das bactérias durante a maturação do mel e, ainda, pela quantidade de minerais presentes no mel (WHITE JUNIOR, 1989 apud RODRIGUES, 2005).

Este método de análise consiste na neutralização da solução ácida do mel, mediante o uso de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH), titulando até pH 8,3, ou ponto de equivalência (BRASIL, 2014b). A análise deve ser realizada em duplicata, onde pesa-se 10 g de mel em um béquer de 250 ml e dissolve em 100 ml de água destilada. Com o auxílio de agitador magnético, mantém-se a amostra em agitação constante, e deve-se inserir o eletrodo do pHmetro digital dentro da solução, para a medição do pH. Com o auxílio de uma bureta contendo solução de hidróxido de sódio

0,1N, adiciona-se vagarosamente NaOH 0,1N, gota a gota, até que a solução de mel atinja pH 8,3 (BRASIL, 2014b) e então realiza-se a leitura, anotando o volume da solução de NaOH gastos para neutralizar a solução e atingir o pH de 8.3 (Figura 15). A acidez do mel é calculada de acordo com a seguinte formula:

Acidez: $V_{base} \times F_{cbase} \times \text{peso da amostra (mEq/Kg)}$.

Onde: V_{base} : é o volume de solução titulante gasto na titulação (ml); F_{cbase} : é o fator de correção da solução titulante (LUTZ, 2008). O resultado do método deve ser expresso em miliequivalentes de ácidos por quilograma (mEq/Kg) de mel. Segundo a IN nº 11 de 2000, a acidez máxima permitida é 50 mEq/Kg (BRASIL, 2000).



FIGURA 15. Determinação da acidez do mel (Fonte: Arquivo pessoal).

5.2.1.3. Pesquisa de Diastase

A diastase, refere-se a enzima alfa-amilase, presente na secreção salivar das abelhas, cuja função é degradar o amido (WHITE, 1992). Este parâmetro é utilizado para avaliar a qualidade do mel e fornece informações sobre o superaquecimento (MENDES et al., 2009), pois sabe-se que quando o mel é aquecido a altas temperaturas, essa enzima é destruída (WHITE, 1992).

Primeiramente pesa-se 10g de mel em um béquer, então dilui-se em 20 ml de água destilada, e adiciona-se a solução a dois tubos de ensaio A e B, com 10 ml cada tubo, além disso, adiciona-se 1 ml de solução de amido a cada tubo. Coloca-se o tubo A em banho-maria a 42-45°C por 1 hora, para que o calor ative a enzima diastase. O outro tubo ficará em temperatura ambiente pelo mesmo período. Passado o período de 1 hora, adiciona-se 1ml de solução de iodo preparado no dia da análise, em ambos os tubos, e então realiza-se a leitura, através da coloração dos tubos. A prova se fundamenta na adição de solução de amido e solução de iodo na amostra, a enzima

diastase está presente em um mel normal, e portanto, ela degradará o amido, e este não reagirá com o iodo, e a solução ficará com coloração verde a castanho (Figura 16), indicando mel puro, já quando for negativa para a presença de diastase, ela não degradará o amido, e este reage com o iodo, e a solução terá coloração azul ou violeta, indicando mel fraudado.



FIGURA 16. Resultado positivo para diástase (Fonte: Arquivo pessoal).

5.2.1.4. Reação de Fiehe

A reação de Fiehe é a prova qualitativa para avaliar a presença de hidroximetilfurfural (HMF) no mel. O HMF é o principal produto da degradação do mel, ou seja, desidratação de açúcares, principalmente frutose, catalisada por ácidos, sendo produzido quando o mel é aquecido, ou armazenado por período prolongado (WHITE, 1992). O aumento da sua concentração é influenciado por baixo pH, acidez, minerais, umidade e temperatura. O HMF é utilizado como um indicador de qualidade, pois pode indicar adulteração com açúcar comercial ou xarope de glicose, estocagem prolongada ou superaquecimento (MENDES et al., 2009).

Dentro de um fluxo laminar pesa-se 5 g de mel em um béquer e com o auxílio de um bastão de vidro, dissolve-se o mel em 5 ml de éter etílico, o éter agirá retirando o HMF do mel. Deve-se então verter a parte líquida (éter) do béquer para uma cápsula de porcelana, e esperar por alguns minutos, até que o éter tenha evaporado completamente. Assim que a cápsula estiver seca, adiciona-se 0,5 ml de solução clorídrica de resorcina 1,0%, que deve ser preparada no dia da análise. O HMF é capaz de reagir com a resorcina em meio ácido, resultando em um composto de condensação com coloração vermelha. Na presença de açúcar comercial ou xarope

de glicose, observa-se na cápsula a imediata coloração vermelho cereja, indicando positividade para presença de HMF (LUTZ, 2008). Se a coloração que formar na cápsula for salmão, indica que o mel foi aquecido intensamente ou que foi estocado por tempo prolongado. O ideal é que esta análise seja negativa, e o fundo da cápsula fique com coloração amarelada, indicando um mel normal (Figura 17).



FIGURA 17. Reação de Fiehe negativa (Fonte: Arquivo pessoal).

5.2.1.5. Determinação de Hidroximetilfurfural (HMF)

Esta prova quantifica o HMF presente no mel, e é realizada principalmente quando a amostra do mel foi positiva na reação de Fiehe. Além disso, permite verificar se a quantidade de HMF presente no produto está dentro do valor máximo permitido pela legislação, que segundo a IN n° 11 de 2000, é de 60 mg/kg (BRASIL, 2000).

A análise deve ser feita em duplicata. Primeiramente pesa-se 5 g do mel em um béquer de 50 ml e anota-se o peso. Transfere-se a amostra pesada para um balão volumétrico de 50 ml, lavando o béquer com no máximo 25 ml de água destilada. Adiciona-se então 0,5 ml da solução de Carrez I (Ferrocianeto de Potássio a 15%), e 0,5 ml da solução de Carrez II (Sulfato de Zinco 30%), ambos preparados no dia da análise. Completa-se o volume do balão com água destilada, e então o conteúdo deverá ser filtrado, com o auxílio de filtros de papel. Após filtração, o conteúdo filtrado é pipetado em dois tubos de ensaio, 5 ml em cada, adiciona-se então 5 ml de água destilada em um dos tubos de ensaio, e no outro, 5 ml de bissulfito de sódio 0,2% (sendo esta a solução de referência para o espectrofotômetro). Deve-se então homogeneizar o conteúdo em vortex, e realizar a leitura da absorbância da amostra. A absorbância é analisada em cubeta de quartzo de 1 cm, a 284 e 336 nm no

espectrofotômetro Spectrum SP 1105. O resultado da análise é calculado conforme a seguinte fórmula: $\text{HMF mg/Kg} = \frac{(A_{284} - A_{336}) \times 149,7 \times 5}{\text{Peso da amostra}}$

Peso da amostra

Onde: A_{284} : leitura da absorbância a 284 nm; A_{336} : leitura da absorbância a 336 nm; 5: massa nominal da amostra e 149,7: $(126/16830) \times (1000/10) \times (1000/5)$, sendo: 126: peso molecular do HMF; 16830: absorvidade molar do HMF a 284 nm; 1000: conversão de g para mg; 10: diluição de 5 g de mel para 50 ml; 1000: conversão de g para kg.

5.2.1.6. Prova de Lund

Esta prova indica a presença de substâncias albuminóides, componentes normais do mel, e quando ausentes, indicam fraude (LUTZ, 2008). A análise baseia-se na adição de ácido tânico na amostra, o qual precipita as substâncias albuminóides presentes no mel. Na presença de mel natural esse precipitado formará um depósito normal de 0,6 a 3,0 ml no fundo de um tubo cônico graduado, em mel artificial essa reação não ocorre, e em caso de mel adulterado, o volume do precipitado aparecerá em menor quantidade, ou será ausente, dependendo da quantidade de xarope de glicose ou açúcar comercial que foi adicionado ao mel (BRASIL, 2014c).

Pesa-se 2 g de mel em um béquer, dissolvendo-o em 20 ml de água destilada, então transfere-se o conteúdo para um tubo cônico graduado. Adiciona-se 5 ml de ácido tânico 0,5%, e completando o tubo com água destilada até atingir 40 ml. O tubo é tampado com rolha, então aguarda-se 24 horas para realizar a leitura (Figura 18).



FIGURA 18. Precipitação de substâncias albuminóides presentes no mel (Fonte: Arquivo pessoal).

5.2.2. Leite

Durante o período de estágio, acompanhou-se as análises físico-químicas de leite pasteurizado, que já foram descritas no item 3.1 deste relatório. Também acompanhou-se as análises de leite materno, e leite provindo de lactários, no qual realizava-se a titulação de acidez pelo método de Dornic, descrita no item 3.1.5. A única diferença com relação a titulação de acidez entre os leites pasteurizados e leites provindos dos lactários, é que segundo a IN nº 62 de 2011, o valor normal da acidez do leite deve estar entre 14 a 18 °D (BRASIL, 2011a), já para leite de lactários, não há um parâmetro de acidez definido.

O leite materno é produzido pela mulher durante o período de lactação, sendo utilizado para alimentar seu bebê por meio da amamentação. O leite materno analisado no SOAP era proveniente do banco de leite humano do Hospital das Clínicas da Unesp de Botucatu. As análises físico-químicas que são rotineiramente realizadas no leite materno são Acidez Dornic e Crematócrito.

5.2.2.1.1. Acidez Dornic

A acidez do leite materno é medida pelo método da acidez titulável, que consiste na titulação de determinado volume de leite por uma solução alcalina de concentração conhecida, utilizando a fenolftaleína como indicador. Esta análise determina se o leite materno poderá ou não ser utilizado para a alimentação de neonatos, pois segundo a RDC nº 171 de 2006 o parâmetro de acidez aceitável, para que o leite possa ser consumido pelos neonatos, deve ser menor ou igual a 8 °D (BRASIL, 2006b) visto que, altos níveis de acidez, causam possíveis prejuízos nutricionais, alteram o sabor e o odor, e reduzem as propriedades imunobiológicas.

Para a realização de análise em leite humano, é necessário o uso de EPIs, como touca, luvas, óculos, máscara e avental. Em recipientes específicos adiciona-se 8 ml de água destilada, 2 ml da amostra de leite materno e 3 gotas de fenolftaleína. Então titula-se com Solução Dornic para leite materno (NaOH N/9), com auxílio de acidímetro de Dornic (Figura 19). É importante salientar que no SOAP, foi definido que cada gota da solução Dornic corresponde a 2,5°D, e valores superiores a 8°D desqualificam o produto para consumo (BRASIL, 2006b).



FIGURA 19. Titulação de acidez pelo método Dornic para leite humano
(Fonte: Arquivo pessoal).

5.2.2.1.2. Crematócrito

O crematócrito consiste em uma técnica analítica para a determinação do teor de creme, que permite o cálculo do teor de gordura e do conteúdo energético do leite humano, e assim, permite identificar os leites maternos com alto teor energético e ideal para os neonatos. De acordo com a RDC nº 171 de 2006, o crematócrito para leite materno deve ser maior ou igual a 250 Kcal/L (BRASIL, 2006b).

Para a realização da técnica faz-se necessário o uso de EPIs. Primeiramente o leite deve ser aquecido em banho-maria a 40°C por 10 min, e com o auxílio de tubo capilar de vidro, recolhe-se uma pequena quantidade da amostra, suficiente para encher 2/3 do tubo capilar, posteriormente, deve-se fechar um dos lados do tubo capilar no fogo, com o auxílio de bico de Bunsen. Realiza-se o mesmo procedimento com todas as amostras que serão analisadas, e então, as amostras são colocadas em centrífuga para microhematócrito, onde serão centrifugadas por 15 minutos. Após centrifugação, a separação do creme, dos demais componentes do leite, é medida em mm, com o auxílio de régua (Figura 20). Anotar os valores obtidos, e através dos seguintes cálculos, obtém-se o resultado de creme (C), gordura (G) e Kcal/L:

$$\%C = \text{mm creme} \times 100 / \text{mm total}$$

$$\%G = \%C - 0,59 / 146$$

$$\text{Kcal/L} = \%C \times 66,8 + 290$$

O SOAP possui tabelas com os resultados de creme, gordura e Kcal já calculados, então após leitura dos capilares, consulta-se a tabela de valores de % de Creme, % de Gordura e Kcal/L para Crematócrito de leite materno.



FIGURA 20. Medição dos componentes do leite materno com régua (Fonte: Arquivo pessoal).

5.2.3. Carnes

Denominam-se carnes as partes musculares comestíveis de diferentes espécies de animais de açougue, manipuladas em condições higiênicas e provenientes de animais que ao abate se apresentam em boas condições de saúde, certificados por médico veterinário responsável pelo serviço de inspeção (BRASIL, 1952). Durante o período de estágio foi possível acompanhar a verificação das características sensoriais das carnes, aferição de pH, prova de H₂S e prova de Éber.

5.2.3.1. Características sensoriais

As características sensoriais assumem grande importância na avaliação da qualidade das carnes, inclusive para avaliar se o produto está bom para o consumo humano, visto que a aparência, a textura, o odor e o sabor da carne se alteram logo no início do processo de deterioração. Para verificar as características sensoriais, observa-se a aparência, avalia-se a textura, e sente-se o odor das carnes, e então classifica-se como característico ou alterado, através dos seguintes parâmetros:

5.2.3.1.1. Aparência

A aparência da carne é própria de cada espécie, mas o que se tem em comum, é que a carne deve ser uniforme, sem acúmulo de sangue, sem a presença de corpos estranhos ou de limo em sua superfície, além disso, é importante salientar

que a cor das carnes deve ser uniforme, sem manchas escuras ou claras, variando de tons avermelhados pardos a rosados conforme as espécies. Com o envelhecimento há escurecimento da superfície das carnes, que progressivamente torna-se acinzentada ou esverdeada pela ação de micro-organismos (LUTZ, 2008).

5.2.3.1.2. Textura

A textura pode variar muito dependendo da espécie, mas normalmente é firme, compacta, elástica e úmida. Sendo que no início da putrefação, a superfície se torna viscosa e a carne perde a firmeza (LUTZ, 2008).

5.2.3.1.3. Odor

O odor de carnes frescas deve ser suave, agradável, e característico de cada espécie. Para carnes velhas, esse odor irá se tornar amoniacal, sulfídrico e posteriormente pútrido, quando estiver em estado de deterioração (LUTZ, 2008).

5.2.3.2. Aferição do pH

Este método tem por objetivo determinar a concentração de íons hidrogênio (pH) da amostra. Esta análise nos fornece informações essenciais sobre a carne, que a define como própria ou imprópria para consumo. O processo de decomposição, seja por hidrólise, oxidação ou fermentação, quase sempre altera significativamente o pH da carne (LUTZ, 2008). A legislação brasileira considera a carne bovina com pH entre 6,0 a 6,4 própria para consumo, carnes com pH 6,4, que não tenham prejuízo da apreciação dos caracteres organolépticos, é considerada em condições de consumo, desde que seja imediato, e carnes com o pH acima de 6,4 são carnes impróprias para o consumo, pois estão em início de decomposição (BRASIL, 1952). Com valores de pH acima de 6,4 há um aumento de crescimento bacteriano, acelerando o processo de putrefação da carne, também pode influenciar na maciez da carne, suculência, e alteração de cor (BARTELS, 1971).

Para a verificação do pH da carne, com o auxílio de pinças e facas previamente lavadas, corta-se a amostra em pequenas porções, de diferentes regiões, e descarta-se o tecido adiposo, grandes vasos e aponeuroses. Esses pequenos

pedaços da amostra são colocados em um béquer, e então adiciona-se água destilada, enchendo em torno de 2/3 do béquer, e com auxílio de bastão de vidro, homogeneiza-se a amostra. Imediatamente realiza-se a leitura do pH, com o auxílio de pHmetro digital, com o eletrodo previamente lavado com água destilada (Figura 21). Quando o pH da carne estiver acima de 6,4 realizavam-se testes complementares, a prova de H_2S e Prova de Éber.

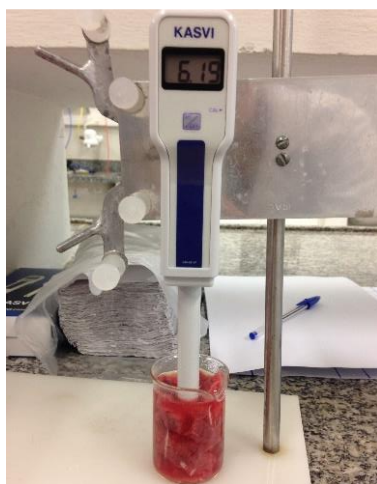


FIGURA 21. Aferição de pH da carne (Fonte: Arquivo pessoal).

5.2.3.3. Reação de Éber para gás sulfídrico (H_2S)

Esta prova é utilizada para evidenciar o início das alterações deteriorativas da carne, e consiste na verificação da presença de gás sulfídrico, proveniente da composição de aminoácidos sulfurados que normalmente são liberados nos estágios de decomposição mais avançados da carne (BARTELS, 1971).

Para realização da técnica, transfere-se 10g de amostra homogeneizada, e adiciona-se 20 ml de água destilada, em Erlenmeyer de 250 ml. No centro de um papel filtro, pinga-se 1-2 gotas de solução de acetato de chumbo 5%, e tampa-se o Erlenmeyer com o papel filtro, e com auxílio de fitas, prende-se o papel à boca do tubo. Coloca-se o frasco de Erlenmeyer dentro de um béquer com água, em cima de um bico de Bunsen, de modo que o béquer seja aquecido por 10 minutos após o início da fervura. Na prova positiva para H_2S , verifica-se uma mancha enegrecida tipo grafite no filtro de papel, e em caso negativo, a mancha formada não é enegrecida (Figura 22). A prova baseia-se na decomposição dos aminoácidos sulfurados, com liberação de enxofre, que em meio ácido transforma-se em sulfeto de hidrogênio, que quando

combinado com acetato de chumbo, produz sulfeto de chumbo, revelando mancha enegrecida espelhada em papel de filtro (LUTZ, 2008).



FIGURA 22. Reação de Éber negativa e positiva para gás sulfídrico (Fonte: Arquivo pessoal).

5.2.3.4. Reação de Éber para amônia

Esta prova é indicada para verificação do estado de conservação de alimentos proteicos, uma vez que pesquisa, na amostra em deterioração, a degradação proteica que leva a produção de amônia, que reage com ácido clorídrico, produzindo cloreto de amônio (BRASIL, 2014d).

Para a realização da prova de Éber para amônia é necessário que se prepare o reagente de Éber no momento em que será utilizado. O reagente de Éber consiste em uma mistura de 1 ml de ácido clorídrico, 1ml de éter etílico e 3 ml de álcool etílico. Após o preparo do reagente, coloca-se 5 ml do reagente em um tubo de ensaio, então, deve-se introduzir um pedaço com cerca de 1 cm da amostra dentro do tubo, com o auxílio de um arame, de maneira que a amostra fique a 1 cm de distância do reagente. Caso haja presença de amônia na amostra, se formará uma nuvem de vapores que irá envolver a amostra, a quantidade e o tempo em que essa nuvem se formará depende do teor de amônia presente na amostra (LUTZ, 2008). A formação do esfumaçado branco, indica a formação de cloreto de amônio, o que confere ao produto resultado positivo de amônia e o torna da qualidade do produto (BRASIL, 2014d) (Figura 23). É desejável que esta prova seja negativa.



FIGURA 23. Reação de Éber positiva para amônia (Fonte: Arquivo pessoal).

5.2.4. Água

A água utilizada para consumo humano deve atender ao padrão de potabilidade de modo que não ofereça riscos à saúde do consumidor. As características das águas potáveis podem variar de acordo com a origem e tratamento recebido, e o conjunto das análises físico-químicas tem grande importância na verificação da qualidade de águas, provenientes de poços, minas, água mineral e de abastecimento público (LUTZ, 2008). Durante o período de estágio, acompanhou-se as análises realizadas em água tratada, em que realizava-se as análises sensoriais de cor, odor e aspecto, determinação do pH, Nitrogênio Amoniacal e cloro residual livre, e de águas não tratadas, onde além das análises citadas, com exceção da análise de cloro residual livre, realizava-se a prova da matéria orgânica.

5.2.4.1. Análises sensoriais

Para a realização das análises sensoriais da água, a mesma deve ser homogeneizada, e transferida para um Becker de vidro, e então visualiza-se o aspecto da água, que deve necessariamente ser límpida e livre de impurezas, observa-se a coloração da água, que deve ser incolor e o odor da água, que deve ser inodora.

5.2.4.2. Determinação do pH

A determinação do potencial hidrogeniônico indica a intensidade da acidez, neutralidade ou alcalinidade da água. A determinação do pH é muito importante, visto que praticamente todos as fases do tratamento da água e de efluentes, como os processos de neutralização, precipitação, coagulação, desinfecção e controle de corrosão, dependem do valor do pH, este valor é utilizado na determinação da alcalinidade, CO_2 e no equilíbrio ácido-base (EMBRAPA, 2011).

Para a aferição do pH deve-se homogeneizar a amostra de água, e transferir 100 ml para um béquer de vidro, e com o pHmetro previamente calibrado (de acordo com as recomendações do fabricante), coloca-se o pHmetro na amostra de água, e aguarda-se 10 minutos para fazer a leitura do pH (Figura 48). De acordo com a portaria nº 2.914 do Ministério da Saúde, recomenda-se que o pH da água seja mantido na faixa de 6,0 a 9,5 (BRASIL, 2011d).



FIGURA 24. Determinação do pH da água com o auxílio de um pHmetro (Fonte: Arquivo pessoal).

5.2.4.3. Determinação da dureza

A dureza da água é calculada como sendo a soma das concentrações de íons cálcio e magnésio, expressos como carbonato de cálcio (CaCO_3) (LUTZ, 2008). Outros cátions como ferro, manganês, estrôncio, zinco e alumínio também podem conferir dureza à água, mas em menor frequência (EMBRAPA, 2011). Pode ser obtida pela soma da dureza temporária, causada pela presença de bicarbonatos de cálcio e

magnésio e da dureza permanente, devido à presença de sulfatos, cloretos e nitratos de cálcio e magnésio (FUNASA, 2006).

Esta prova deve ser realizada em duplicata, primeiramente, deve-se homogeneizar a água, e com o auxílio de uma pipeta volumétrica, transferir 100 ml da amostra homogeneizada para um erlenmeyer de 250 ml. Dentro de uma capela, adiciona-se à amostra 2 ml de solução-tampão para dureza (que consiste em uma diluição de água destilada com cloreto de amônio, hidróxido de amônio e sal Mg-EDTA), adiciona-se uma pequena quantidade de Negro de Eriocromo T em pó, e titula-se a amostra com solução de EDTA 0,01 M (que consiste em sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético dihidratado diluído em água destilada). O princípio desta reação consiste no fato de que o ácido etilenodiaminotetracético e seus sais sódicos (EDTA) formam complexos quelados solúveis com certos cátions metálicos. Uma solução contendo íons de cálcio e magnésio, com uma pequena quantidade do indicador negro de eriocromo T, torna-se púrpura. Titulando-se essa solução com EDTA, cálcio e magnésio serão quelados e uma viragem de cor púrpura a azul indicará o ponto final (Figura 25) (LUTZ, 2008).

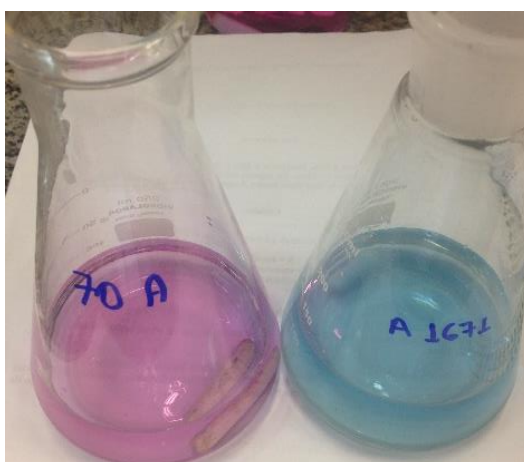


FIGURA 25. Determinação da dureza da água (Fonte: Arquivo pessoal).

O resultado deve ser ajustado através da seguinte fórmula:

$$\text{mg CaCO}_3/\text{L} = \frac{V \times \text{fc (EDTA)} \times 1000}{\text{Volume da amostra}}$$

Onde V: é o volume de EDTA que foi gasto para a viragem da coloração roxa para azul e fc: é o fator de correção do EDTA.

A água é classificada como mole (quando a dureza for $<50 \text{ mg CaCO}_3/\text{L}$), dureza moderada (quando a dureza estiver entre $50\text{--}150 \text{ mg CaCO}_3/\text{L}$), dura (quando

a dureza estiver entre 150–200 mg CaCO_3/L) e muito dura (quando a dureza for >300 mg CaCO_3/L). O valor máximo de dureza permitido para a água potável é de 500 mg/L em termos de CaCO_3 (BRASIL, 2011d).

5.2.4.4. Nitrogênio Amoniacal

A prova do nitrogênio amoniacal é utilizada para determinar a amônia presente na amostra de água. A presença da amônia nas águas de superfície pode ser resultante da desaminação de compostos orgânicos que contêm nitrogênio por atividade microbiológica ou pela hidrólise da ureia, ou pode ter se originado durante o tratamento da água, devido à combinação com o cloro, formando cloroaminas (LUTZ, 2008). Em águas naturais, os teores de amônia são relativamente baixos, mas concentrações mais altas podem ser encontradas em esgotos e efluentes industriais, indicando assim, que altas concentrações de amônia em águas superficiais podem ser causadas por contaminação por esgoto, efluentes industriais ou fertilizantes (EMBRAPA, 2011). O parâmetro de aceitação de amônia em água para consumo humano, é de 1,5 mg/L (BRASIL, 2011d).

Para a realização desta prova, é necessário homogeneizar a amostra de água, e transferir 50 ml da amostra para uma proveta de 50 ml com tampa. Então adiciona-se 1 ml de tartarato duplo de sódio e potássio, e 2 ml do reagente de Nessler (constituído de Iodeto de mercúrio). Agita-se a amostra com cuidado. Se houver formação de coloração amarela intensa a prova é considerada positiva, ou seja, presença de nitrogênio amoniacal na água, e se a coloração se mantiver incolor, ou levemente amarelada, considera-se negativo, não há nitrogênio amoniacal na amostra, durante o período de estágio nenhuma amostra analisada foi positiva.

5.2.4.5. Cloro residual livre

A análise de cloro residual livre é realizada somente em águas tratadas, visto que o cloro é um produto químico que é utilizado para a desinfecção da água. Os principais produtos utilizados na água são hipoclorito de cálcio, cal clorada, hipoclorito de sódio e cloro gasoso (FUNASA, 2006). Quantificar o cloro residual livre é muito importante como medida de controle da dosagem que está sendo aplicada na água, visto que a portaria nº 2.914 de 2011 do MS, determina a obrigatoriedade de que a

água fornecida contenha um teor mínimo de cloro residual livre de 0,5 mg/L (BRASIL, 2011d).

Por ser uma análise quantitativa deve ser realizada em duplicata. Primeiramente a amostra deve ser bem homogeneizada, e então, com o auxílio de uma pipeta volumétrica, transfere-se 100 ml da amostra para proveta de 100 ml (utilizar 3 provetas). Adiciona-se 5 ml de solução de orto-tolidina em duas provetas, e na terceira proveta, não adicionar a solução, pois esta proveta será o branco para a leitura no espectrofotômetro. Transfere-se 5 ml da amostra para cubetas de acrílico, realiza-se então a leitura da absorbância ao comprimento de onda de 465 nm em espectrofotômetro. A orto-tolidina em meio ácido é oxidada pelo cloro residual livre e combinado, produz um composto amarelo, proporcional à quantidade de cloro presente, portanto, quanto mais amarela a amostra ficar após a adição de orto-tolidina, maior a quantidade de cloro contida na amostra (Figura 26). Os resultados da absorbância devem ser ajustados, com o auxílio da seguinte fórmula: $CRL: 3,6470 \times (A + 0,0027)$.

Onde A: corresponde ao valor da absorbância de cada amostra.

Como a análise é feita em duplicata, deve-se realizar a média e o desvio padrão dos valores obtidos na fórmula. O resultado é expresso em mg/L de CRL.



FIGURA 26. Cubetas de acrílico para a leitura da absorbância (Fonte: Arquivo pessoal).

5.2.4.6. Matéria orgânica

Esta análise é realizada em águas não tratadas com cloro. Indica a matéria orgânica de maneira indireta, baseada na concentração de oxigênio consumido para oxidar a matéria orgânica, em meio ácido e altas temperaturas, por ação de um agente

químico oxidante (Permanganato de potássio), o resultado é expresso em termos de oxigênio consumido, que reflete uma demanda química de oxigênio (VALENTE et al., 1997). O oxigênio tem forte ligação com a matéria orgânica, pois a adição de matéria orgânica à água, consome o oxigênio dissolvido na mesma, através de oxidação química e bioquímica, via respiração de micro-organismos, depurando a matéria orgânica. O limite de detecção de oxigênio consumido neste método é de 0,1 mg/L (VALENTE et al., 1997).

Primeiramente a amostra deve ser homogeneizada, e com o auxílio de pipeta volumétrica, 100 ml da amostra devem ser colocados em Erlenmeyer de 500 ml, a análise é realizada em duplicata. Então adiciona-se 10 ml de Ácido Sulfúrico 25%, e com o auxílio de Bico de Bunsen, aquecer a amostra até começar a evaporar ($>65^{\circ}\text{C}$), então adicionar 10 ml de Permanganato de potássio (KMnO_4), e deixar mais 10 minutos sobre o fogo, então homogeneizar a amostra, e adicionar 10 ml de solução de Ácido Oxálico 0,0125 N. Se a coloração da amostra ficar rósea é considerada ausência de matéria orgânica na amostra (Figura 27).



FIGURA 27. Amostras negativas para a análise de matéria orgânica em água (Fonte: Arquivo pessoal).

Mas se a coloração for transparente ou levemente amarelada, é necessário titular a amostra com permanganato de potássio, até que ocorra a viragem da cor para rosa. Durante a titulação, a amostra deve permanecer rosa no mínimo por 30 segundos, para que se verifique o ponto de viragem. Para obtenção do resultado é necessário realizar o ajuste do valor obtido na titulação, através da fórmula:

Matéria Orgânica (Mg/L): $V (\text{KMnO}_4) \times \text{fc do Ácido Oxálico}$

Onde V: Volume de permanganato de potássio utilizado e fc: Fator de correção do ácido oxálico.

Como a análise é realizada em duplicata, deve-se realizar a média e o desvio padrão dos resultados obtidos. O resultado é expresso em Mg/L.

5.2.5. Produtos de Cesta Básica

Durante o período de realização do estágio, acompanhou-se as análises físico-químicas realizadas em 29 produtos provindos de cesta básica. Para todos os produtos realizou-se análises de Umidade e Resíduo Mineral Fixo (cinzas), em produtos que continham proteínas, realizou-se análise para proteínas, em produtos que continham lipídeos, realizou-se análises para lipídeos em extrato etéreo, e para alguns produtos como Sardinha em óleo, maionese e leite em pó instantâneo, os lipídeos foram determinados por butirometria. Além disso, para produtos como sal extra refinado, tempero completo sem pimenta e alho, analisou-se NaCl.

5.2.5.1. Resíduo Mineral Fixo (Cinzas)

O resíduo mineral fixo é obtido através da eliminação da matéria orgânica e inorgânica volátil de uma amostra de alimento, à temperatura de 550°C e fundamenta-se na perda de peso que ocorrerá quando a amostra for incinerada (LUTZ, 2008). A análise de cinzas foi realizada para todos os alimentos da cesta básica.

Primeiramente as cápsulas de porcelana que serão utilizadas para a determinação das cinzas devem ser condicionadas em Mufla de cerâmica, em temperatura de 550°C por 1 hora. Esse aquecimento prévio é realizado afim de evitar a presença de resíduos, umidade, gordura, e poeira dentro da cápsula de cerâmica. Após o condicionamento, as cápsulas são colocadas em dessecador com sílica gel, até esfriarem. Quando estiverem frias, pesa-se as cápsulas e anota-se seu respectivo peso, então pesa-se 2 g da amostra que será analisada, e anota-se o peso da capsula, a amostra é quantitativa e portanto deve ser realizada em duplicata. As amostras serão colocadas na Mufla a 550°C por 6 horas. Após a incineração, dentro da cápsula de porcelana só restará o resíduo mineral fixo que deve ser pesado, e seu peso anotado (Figura 28). O resíduo mineral fixo da amostra será obtido com o auxílio da seguinte formula: Cinzas %:
$$\frac{\text{Peso das cinzas} - \text{Peso da cápsula}}{\text{Peso da amostra}} \times 100$$

Peso da amostra

É necessário fazer a média e o desvio padrão dos resultados dos cálculos de cada amostra, pois a análise foi realizada em duplicata.



FIGURA 28. Pesagem do resíduo mineral fixo (Fonte: Arquivo pessoal).

5.2.5.2. Umidade

O valor da umidade dos alimentos é obtido através da perda de umidade por dessecação por secagem direta em estufa a 105°C. Todos os alimentos contêm água em maior ou em menor proporção, independentemente do método de industrialização que tenha sido submetido, a umidade geralmente representa a água contida no alimento, e corresponde à perda em peso, sofrida pelo produto quando aquecido em condições nas quais a água é removida (LUTZ, 2008). A umidade foi analisada para todos os alimentos da cesta básica.

As cápsulas de porcelana que serão utilizadas na análise devem ser previamente condicionadas, neste caso, são condicionadas em estufa à 105°C durante 1 hora, e após serem condicionadas, serão colocadas em dessecador com sílica gel, até esfriarem. Primeiramente deve-se pesar as cápsulas de porcelana sem a amostra, e posteriormente, pesar 5 g da amostra, e anotar ambos os valores, esta análise é realizada em duplicata. Depois de pesadas, as amostras são colocadas em estufa para dessecação, onde permanecem por 4 horas, à uma temperatura de 105°C. Após a dessecação, as amostras devem ser esfriadas em dessecador com sílica gel (Figura 29) e então pesadas, anotar o peso e utilizar a seguinte fórmula:

$$\text{Umidade \%} = \frac{\text{Peso da cápsula} + \text{Peso da amostra} - \text{Peso final (sem umidade)}}{\text{Peso da amostra}} \times 100$$

É necessário fazer média e desvio padrão dos resultados dos cálculos de cada amostra, pois a análise foi realizada em duplicata.



FIGURA 29. Amostras dessecadas, em dessecador com sílica gel (Fonte: Arquivo pessoal).

5.2.5.3. Determinação de Proteínas

A determinação de proteínas é realizada através da metodologia Kjeldahl, que permite a determinação indireta de proteínas em várias amostras de alimentos. O método é baseado na decomposição da matéria orgânica através da digestão da amostra a 400°C com ácido sulfúrico concentrado, em presença de sulfato de cobre como catalisador que acelera a oxidação da matéria orgânica. O nitrogênio da amostra é transformado em sulfato de amônio através da digestão com ácido sulfúrico, e posterior destilação com liberação da amônia, que é fixada em solução ácida e então, titulada (GALVANI & GAERTNER, 2006).

O procedimento divide-se em três etapas, a primeira etapa é a digestão, realizada em Digestor Macro para Proteínas. Primeiramente, com auxílio de balança analítica, pesa-se 0,5 g da amostra a ser analisada em papel canário, a análise é feita em duplicata. O papel canário contendo a amostra deve ser transferido para Tubo de Kjeldahl, em seguida, adiciona-se 2,5 g de mistura catalítica e 10 ml de ácido sulfúrico (densidade 1,825). Colocar as amostras em Digestor Macro para Proteínas, e elevar a temperatura do digestor, até atingir 400°C, por período de 4 horas. O aquecimento da amostra, com ácido sulfúrico concentrado, fará com que o carbono e o hidrogênio sejam oxidados. O carbono será transformado em dióxido de carbono (CO_2) e o hidrogênio em água (H_2O). O nitrogênio da proteína será reduzido e transformado em sulfato de amônio. A mistura catalítica tem a finalidade de aumentar a temperatura de

ebulição do ácido e aumentar a velocidade de oxidação da matéria orgânica. Haverá uma mudança de coloração da amostra, pois o carbono contido na matéria orgânica é oxidado e o dióxido de carbono (CO_2) se desprende, e a solução passa de uma coloração escura, para uma tonalidade verde claro (GALVANI & GAERTNER, 2006).

Após a digestão, espera-se a amostra esfriar, e adiciona-se 10 ml de água destilada, então inicia-se o processo de destilação, que é realizada por arraste de vapor, em Destilador de Nitrogênio/Proteína. É necessário conferir o nível de água no aparelho, e então deixa-lo aquecer por 10 minutos para começar a análise. Primeiro deve-se adaptar o tubo de Kjeldahl ao destilador, e adicionar 25 ml da solução de hidróxido de sódio a 45%. Deve-se acoplar o Erlenmeyer contendo 10 ml de ácido sulfúrico 0,1 N com 5 gotas de vermelho de metila. O sulfato de amônio é tratado com hidróxido de sódio a 45%, ocorrendo a liberação de amônia gasosa, que será fixada em solução ácida e coletada no Erlenmeyer. O processo de destilação será realizado durante 5 minutos, e então realiza-se a titulação com hidróxido de sódio 0,1 N, para determinação da dosagem de nitrogênio amoniacal. Logo após a destilação, o líquido contido no Erlenmeyer possui coloração rósea, a titulação é realizada até a viragem da coloração rósea, para uma coloração amarelada (Figura 30).

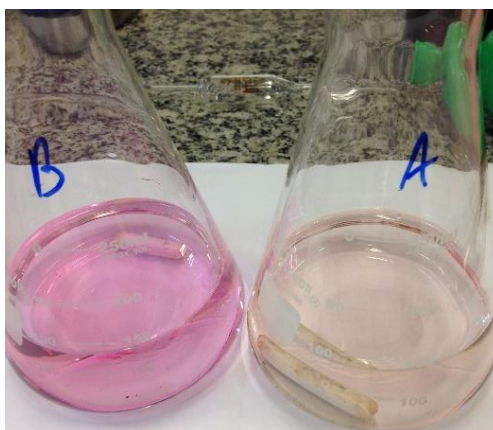


FIGURA 30. Determinação da dosagem de nitrogênio através de titulação (Fonte: Arquivo pessoal).

Após titulação, o valor da dosagem deve ser corrigido com o auxílio das fórmulas a seguir:

$$V: \text{Vol} (\text{H}_2\text{SO}_4) \times Fc (\text{H}_2\text{SO}_4 0,1\text{N}) - \text{Vol} (\text{NaOH} 0,1\text{N}) \times Fc (\text{NaOH} 0,1\text{N})$$

$$\% \text{PTN}: \frac{V \times 0,14 \times \alpha}{\text{Peso da amostra}}$$

Peso da amostra

Onde α : Produtos cárneos: 6,25; Lácteos: 6,38 e Vegetais: 5,74.

5.2.5.4. Determinação de Lipídios

A determinação dos lipídios dos alimentos da cesta básica foi realizada a partir de dois métodos diferentes, a técnica de determinação de lipídios no butirômetro (item 3.1.7), e a determinação de lipídios no extrato etéreo, que é feita pela extração contínua dos lipídios com solvente (éter etílico), em aparelho do tipo Soxhlet, seguida de remoção por destilação do éter. O resíduo obtido pela extração é chamado de extrato etéreo, e é constituído por todos os compostos que possam ser extraídos pelo solvente, como ácidos graxos livres, ésteres de ácidos graxos, lecitinas, ceras, carotenóides, etc. (LUTZ, 2008).

Primeiramente é necessário que o copo de Soxhlet que será utilizado na análise seja preparado, em estufa a 125°C por 1 hora. Após o aquecimento, o copo deve ser resfriado em dessecador com sílica em gel, e então estará pronto para uso. Os copos devem ser pesados individualmente, e seu peso deverá ser anotado pois será utilizado no cálculo de correção. Pesa-se 2 g da amostra de alimento em cartucho de celulose, e anota-se o peso, a análise será realizada em duplicata. Tanto o copo de Soxhlet quanto o cartucho não devem entrar em contato com as mãos do manipulador, pois a gordura das mãos poderia alterar os resultados, por isso é importante o uso de luvas e de pinças.

Após pesar a amostra, deve-se completar o cartucho com algodão, que possibilitará que o éter se disperse de maneira mais homogênea na amostra, no momento da destilação. O copo e o cartucho devem ser devidamente encaixados no Determinador de Gordura. Dentro de cada copo de Soxhlet deverão ser adicionados 80 ml de éter etílico, e então os cartuchos devem ser descidos, de forma que encostem no éter. O aparelho deverá estar em temperatura de 90°C durante 6 horas. Durante o período de destilação, o éter passará inúmeras vezes pela amostra, e a gordura será extraída pelo éter, e se depositará no fundo do copo de Soxhlet, após o tempo de destilação, o copo deverá ser colocado em estufa para secagem, então deverá ser resfriado em dessecador de sílica gel, e após resfriado, deverá ser pesado, e seu peso anotado (Figura 31). A determinação dos lipídios presentes na amostra será realizada pela seguinte fórmula: % lipídios: $\frac{\text{Peso final} - \text{Peso do copo}}{\text{Peso da amostra}} \times 100$

Peso da amostra



FIGURA 31. Pesagem de extrato etéreo contido no copo de Soxhlet (Fonte: Arquivo pessoal).

5.2.5.5. Determinação de cloretos

A análise para determinação de cloretos foi realizada para três produtos da cesta básica, o sal refinado, o alho, e o tempero completo sem pimenta. Esta análise foi realizada com o objetivo da comprovação do padrão de identidade e qualidade do sal, tempero e alho.

Para realização da análise deve-se pesar 0,2 g da amostra em béquer de 100 ml e anotar seu respectivo peso, a análise é realizada em duplicata. A amostra deve ser levada para a estufa a 45°C até sua fusão. Após retirar a amostra da estufa, adiciona-se 15 ml de água destilada a 40°C (para auxiliar na dissolução) e 0,5 ml de cromato de potássio a 5%, e então titula-se com nitrato de prata 0,1 N, até que ocorra a viragem da coloração amarela, para uma coloração laranja/tijolo (Figura 32).



FIGURA 32. Titulação de cloretos (Fonte: Arquivo pessoal).

COOPERATIVA AGROINDUSTRIAL C.VALE – ABATEDOURO DE AVES E COELHOS

6. DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO

Parte do estágio supervisionado obrigatório foi realizado no Abatedouro de Aves e Coelhos da C. Vale - Cooperativa Agroindustrial, localizado em Palotina, Paraná, sob a orientação da Médica Veterinária encarregada pela gestão de qualidade Monica Casali. O estágio iniciou em 26 de setembro, terminando em 25 de novembro de 2016.

O complexo avícola da C.Vale está em operação desde 1997, sendo composto por fábricas de rações, matrizeiro, incubatório, aviários de campo, abatedouro e indústria de termoprocessados. A cooperativa possui um sistema de integração de ciclo completo, dominando todos os processos produtivos, da alimentação à industrialização do frango, abastecendo a maioria dos estados brasileiros e ainda exportando seus produtos para mais de 70 países (CVALE, 2016).

Além da produção avícola, a C.Vale destaca-se também na produção de soja, milho, trigo, mandioca, leite e suínos, atuando na prestação de serviços, com mais de 260 profissionais que dão assistência agrônômica e veterinária aos associados. Além disso, a cooperativa mantém uma rede de supermercados com oito lojas no Paraná, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Possui 141 unidades de negócios, mais de 18.000 associados e 7.500 funcionários, atuando no estado do Paraná, Santa Catarina, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rio Grande do Sul e Paraguai (CVALE, 2016).

6.1. ÁREA FÍSICA DA C.VALE

A C.Vale possui 141 unidades de negócios, localizados na região Sul e Centro-oeste do Brasil. O estágio foi realizado na Gestão de Qualidade do abatedouro de aves, localizado no complexo industrial, em Palotina (Figura 33). Atualmente o abatedouro conta com 3 linhas de abate, que industrializam mais de 150 cortes de frango, com capacidade para abater 430 mil aves por dia.



FIGURA 33. Complexo avícola da C.Vale (Fonte: cvale.com.br).

7. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

O estágio foi realizado na Gestão da qualidade do abatedouro de aves, onde desenvolveu-se atividades de acompanhamento de todo o processo de abate, desde a recepção das aves no abatedouro, até a expedição dos produtos prontos, também pude acompanhar a função de cada um dos operadores de qualidade dentro do abatedouro, leitura dos programas de qualidade, como POPs, PPHO, APPCC, BPF, PSO, etc. Além disso, houve a oportunidade de acompanhar as auditorias internas e externas realizadas no abatedouro, acompanhamento de reuniões e desenvolvimento de projetos, buscando a melhoria contínua.

7.1. PROCESSO PRODUTIVO E AÇÃO DOS OPERADORES DE QUALIDADE

Os frangos destinados ao abate são criados no sistema de integração avícola da C.Vale, composto pela fábrica de ração, matrizeiro, incubatório, fomento avícola, abatedouro e indústria de termoprocessados. Os ovos são produzidos em dois matrizeiros de acesso controlado, e posteriormente, são transferidos ao incubatório, onde os pintinhos serão distribuídos aos produtores que fazem parte do sistema de integração. As aves são alojadas em granjas e quando atingem o peso ideal, são abatidas e processadas no abatedouro de aves da cooperativa. O abatedouro possui certificados ISO 9001, BRC e HACCP, a cadeia produtiva de frangos possui os certificados HACCP, Global GAP e Global GAP/CFM, e a indústria de termoprocessados opera segundo a norma BRC (CVALE, 2016).

Os operadores de qualidade que trabalham na produção realizam a verificação do processo produtivo como um todo, desde a recepção das aves vivas, até a expedição dos produtos finais, realizam a verificação de cada setor do processo e de todos os produtos. A atuação de cada operador será descrita juntamente com a descrição do processo produtivo.

7.1.1. Recepção das aves

Os frangos vivos provenientes dos aviários da integração C.Vale, são previamente liberados para o abate por equipe técnica do fomento, que verifica o cumprimento da carência de medicamentos, sanidade animal, jejum pré-abate

(retirada da alimentação 6 horas antes do abate), dieta hídrica (fornecimento de água durante o período de jejum pré-abate) e emitem a GTA. As aves são abatidas em média com 2,9 kg, aos 42 à 45 dias de vida. Os frangos são recolhidos por uma equipe de carregamento e transportados dentro de gaiolas plásticas em caminhões até o abatedouro, atendendo à todos os requisitos de bem-estar animal.

Todos os lotes destinados ao abate devem conter nota fiscal, GTA, boletim sanitário e ficha de controle do aviário, todos assinados pelo médico veterinário responsável pelo lote. A ficha de controle do aviário, o boletim sanitário e a GTA devem ser fornecidas ao SIF, 24 horas antes do abate do lote.

Ao chegarem no abatedouro os caminhões são pesados, e neste momento o PCC 1Q era realizado, este é o primeiro Ponto Crítico de Controle do processo, que visa prevenir, reduzir e eliminar o perigo químico de resíduos de medicamentos no produto final. Analisa-se a ficha de acompanhamento do aviário, com os demais documentos entregues ao SIF, verificando os medicamentos utilizados, seus princípios ativos, e o atendimento do período de carência de cada medicamento, evitando abater lotes que possam apresentar resíduos químicos. Enquanto a avaliação não for registrada no sistema, liberando o lote, o caminhão fica bloqueado para o abate.

7.1.2. Galpão de espera

Os caminhões provenientes do campo permanecem nos galpões de espera do abatedouro, até serem liberados para o abate. Este galpão possui equipamento de ventilação e nebulização, que são fundamentais para reduzir a temperatura corporal das aves, propiciando maior conforto térmico e bem-estar as mesmas, e diminuindo as perdas e mortes que podem ser causadas por calor excessivo e estresse das aves. O sistema de climatização é automático, medindo a temperatura e a umidade relativa do ar, e através desses dados, o sistema de climatização será acionado.

Um monitor observa constantemente o funcionamento dos ventiladores, aspersores e nebulizadores, assim como o funcionamento do sistema automático de climatização, a integridade do galpão de espera e das cortinas (Figura 34) e principalmente o conforto térmico das aves, verificando a presença de aves que estejam com a respiração ofegante, ou então aglomeradas nos cantos das gaiolas, caracterizando estresse térmico pelo calor, e pelo frio, respectivamente. Uma vez por

turno, um operador da qualidade verifica os mesmos itens verificados pelo monitor, e se a verificação do monitor está sendo satisfatória.



FIGURA 34. Galpão de espera (Fonte: Arquivo pessoal).

7.1.3. Descarregamento e lavagem de gaiolas e caminhão

Existem três linhas de abate e portanto três linhas de descarregamento de aves, sendo uma automatizada e duas manuais. Nas plataformas de descarregamento, as gaiolas são retiradas do caminhão e encaminhadas para a pendura através de esteiras rolantes. Os frangos mortos eram encaminhados para fábrica de subprodutos, e os frangos vivos seguiam para pendura.

Neste momento ocorre a inspeção *ante-mortem*, realizada pelo SIF, o órgão é responsável pela avaliação e liberação, ou não, do lote para o abate. Não houve acompanhamento da Inspeção Federal durante o período do estágio.

As gaiolas vazias são pré-lavadas em máquina exclusiva para lavagem das gaiolas, em equipamento próprio com renovação de água constante, e depois de lavadas, são desinfetadas. O mesmo ocorre com o caminhão vazio, que passará pelo processo de pré-enxague, lavagem com detergente, enxágue e sanitização. Após esta etapa de limpeza e sanitização, as gaiolas limpas serão carregadas e empilhadas no caminhão, na plataforma de carregamento, então o caminhão será pesado e retornará ao campo, para o carregamento de um novo lote de aves. Há um operador da qualidade que verifica visualmente se a limpeza e a sanitização dos caminhões e caixas está sendo realizada de forma correta, além de verificar a concentração de detergente e sanitizante utilizada no processo. Além disso, são coletados *swabs* do

caminhão e das caixas depois de limpas e desinfetadas, os *swabs* são destinados ao laboratório avícola da C.Vale, para realização de análises afim de verificar a eficácia do processo de lavagem e sanitização.

7.1.4. Pendura

Na pendura as aves são retiradas das gaiolas plásticas e penduradas em nórias, sendo uma etapa potencialmente dolorosa para a ave, podendo provocar um percentual significativo de lesões hemorrágicas nos pés e pernas, por onde as aves são penduradas. Visando minimizar os problemas decorrentes do processo, e que possam causar dor ou sofrimento às aves, a C.Vale realiza treinamentos constantes com os funcionários da pendura, para garantir o correto posicionamento das aves nos ganchos, retirada das aves das gaiolas de forma cuidadosa, e pendura com os dois pés, além disso, a iluminação da sala de pendura (luz azul) é mantida baixa e constante para evitar o estresse, possui apoio para o peito (parapeito) ao lado da nórea (Figura 35) e ausência de iluminação no túnel que conduz as aves até a insensibilização. Todos os cuidados descritos acima são verificados por operador da qualidade, afim de garantir o bem-estar animal na pendura das aves vivas.



FIGURA 35. Pendura de aves vivas (Fonte: Arquivo pessoal).

7.1.5. Insensibilização

O método de insensibilização utilizado na C.Vale é a eletronarcoose em cubas de imersão. As aves que foram previamente penduradas pelas duas pernas, em ganchos de metal, são imersas em uma cuba de metal com água eletrificada, de forma

que a corrente elétrica da cuba flua para as aves, dissipando-se para o gancho, causando a perda de consciência imediata. Sendo importante frisar que a insensibilização não deve promover, em nenhuma hipótese, a morte das aves (BRASIL, 1998a).

Segundo o Programa Nacional de Abate Humanitário, este método é eficiente, quando utilizado de forma correta e com os parâmetros elétricos adequados, minimizando o sofrimento, e com poucos efeitos na qualidade da carcaça e da carne. A eletronarcose provoca a despolarização dos neurônios e insensibilização em 15 milésimos de segundo, e o estímulo da dor só é interpretado pelo organismo da ave em torno de 150 a 200 milésimos de segundos, assegurando assim, a ausência de dor (LUDTKE et al., 2010). O efeito da eletronarcose é temporário, por isso, o tempo entre a aplicação da corrente elétrica e a sangria não deve exceder 12 segundos (BRASIL, 1998a), para que a ave não retorne a consciência antes de ser sangrada, e continue insensível à dor, até a morte.

Para garantir o bem estar animal, a C.Vale possui um funcionário encarregado por monitorar as aves que saem da cuba, avaliando os sinais característicos de uma ave bem insensibilizada e os sinais de falha de insensibilização e retorno à consciência. As aves bem insensibilizadas, no início da fase tônica, apresentam pescoço arqueado, asas fechadas ao corpo, tremor involuntário constante do corpo e das asas, olhos abertos, pernas estendidas e ausência de respiração rítmica. Após a fase tônica inicia-se rapidamente a fase clônica, onde observa-se movimentos das pernas, movimentos descordenados das asas, e ausência de reflexos oculares e da terceira pálpebra (LUDTKE et al., 2010).

Já os sinais de falha na insensibilização se caracterizam por tensão no pescoço (pescoço em formato de “S”), movimento coordenado das asas, retorno da respiração rítmica e tentativa de endireitamento na nórea (LUDTKE et al., 2010). Além dos monitores que controlam a ausência desses reflexos, a gestão da qualidade os avalia quatro vezes por turno, pela avaliação de 50 aves na saída da cuba de insensibilização e 50 aves após a sangria. Além de verificar os sinais de insensibilização, verifica-se a cuba de insensibilização (Figura 36), verificando o volume de água da cuba, a corrente elétrica que está sendo aplicada, o tempo de aplicação da corrente elétrica, a profundidade de imersão das aves, que devem estar imersas até à base das asas, a programação do equipamento, e se a atividade do monitor está sendo realizada de forma correta.

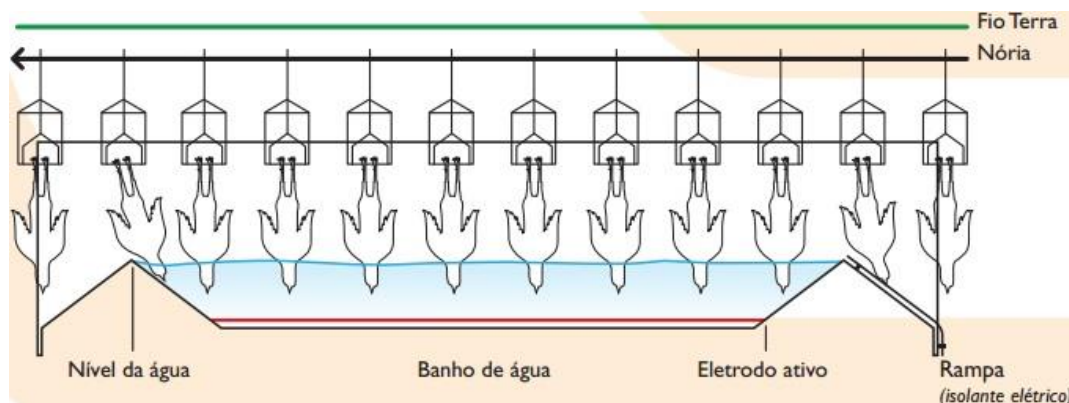


FIGURA 36. Representação da Cuba de atordoamento com nória para frangos (Fonte: <http://www.poloeletronica.com.br/>).

7.1.6. Sangria

A sangria deve ser iniciada logo após a insensibilização, de modo a provocar um rápido, profuso e mais completo escoamento de sangue, antes que o animal recupere a sensibilidade. A operação de sangria é realizada manualmente, por funcionários treinados e religiosos, atendendo todas as especificações do abate Halal segundo o *Codex Alimentarius* (1997), pela secção das artérias carótidas e veias jugulares do pescoço, e do corte do esôfago e da traquéia, evitando a completa incisão da cabeça.

A sangria deve ser realizada de modo que o tempo entre a insensibilização e a sangria, não exceda 12 segundos (BRASIL, 1998a). Recomenda-se esse tempo máximo entre a insensibilização e a sangria porque a recuperação da consciência, quando se utiliza a eletronarcore, ocorre em média em 45 segundos. Desta forma, se a sangria for efetuada no tempo correto, assegurará a inconsciência da ave até a morte. Visto que, é inadmissível a entrada de aves conscientes no tanque de escaldagem (LUDTKE et al., 2010).

Após a realização da sangria, as aves passarão pelo túnel de sangria, onde permanecem por um período de 3 minutos, conforme estabelecido pela legislação brasileira (BRASIL, 1998a). No túnel de sangria ocorre a perda do sangue corporal da ave, ocasionando morte por choque hipovolêmico, e garantindo assim, a morte de todas as aves antes da escaldagem. O sangue do túnel de sangria é coletado por calhas e destinado à fábrica de subprodutos.

A eficácia do processo de sangria é avaliada regularmente por monitores, e pela gestão da qualidade, que avalia 100 aves antes de entrarem no processo de escaldagem.

7.1.7. Escaldagem

O processo de escaldagem consiste em lavar as aves com água aquecida, facilitando a remoção mecânica das penas pelo amolecimento do bulbo piloso, além disso, remove impurezas e sangue da superfície externa das aves.

Na C.Vale a escaldagem é realizada em dois tanques de escaldagem com água aquecida, adição de vapor e agitação da água por borbulhamento, onde a temperatura do primeiro tanque está em torno de 50-55°C, e do segundo tanque entre 55-60°C, nas três linhas de abate. Os tanques possuem um sistema de controle de temperatura e renovação contínua de água, de maneira que a cada turno de trabalho (8 horas), a renovação de água dos tanques deverá ser o correspondente ao seu volume total, conforme determinado na Portaria nº 210 (BRASIL, 1998a). Nesta etapa, um operador da qualidade verifica os registros de vazão e de temperatura de ambos os tanques de escaldagem, das três linhas, uma vez por turno de trabalho.

7.1.8. Depenagem

A depenagem é o processo de remoção mecânica das penas. Executada com a ave suspensa pelos pés, logo após a escaldagem. A C.Vale conta com cinco depenadeiras, sendo a primeira, uma depenadeira de sambiquira, seguida por três depenadeiras de carcaça, e um foliculador de sambiquira. As penas retiradas das carcaças e sambiquira são carregadas, através da água de chuveiros dispostos nas depenadeiras, para canaletas, e então serão destinadas à fábrica de subprodutos.

Após a depenagem mecânica, as aves passam por uma verificação realizada por funcionários do abatedouro, afim de verificar e retirar manualmente as penas que não foram removidas pelas depenadeiras. Além disso, a gestão da qualidade avalia 100 aves, uma vez por turno, para verificar a eficiência da depenagem, avaliando penas remanescentes nas asas e sambiquira.

Após a depenagem ocorre a pré-inspeção *ante-mortem*, realizada pelo Serviço de Inspeção Federal, e tem como objetivo retirar da linha de abate aves com

ascite, artrite, mal sangradas, escaldagem excessiva, desidratação e caquexia. Durante o período de estágio não houve acompanhamento do SIF.

7.1.9. Corte de pés e cabeça

Nesta etapa a cabeça e os pés são retirados, sendo a cabeça destinada para a fábrica de subprodutos, e os pés direcionados para escaldagem. A temperatura do tanque de escaldagem dos pés é de 48 a 70°C, e os tanques possuem renovação de água constante, de modo que a cada troca de turno, a renovação de água seja condizente ao volume total de água do tanque (BRASIL, 1998a). Depois da escaldagem, a película amarela dos pés é retirada, e os mesmos são classificados em grade A, grade B, ou fábrica de subprodutos.

A classificação é realizada conforme a qualidade do pé, ou seja, na grade A, os pés não podem conter lesões, calos e/ou fraturas, já na grade B, os pés podem apresentar calos e fraturas, desde que não sejam exuberantes. Os pés destinados para a fábrica de subprodutos, são aqueles dilacerados, com calos múltiplos e lesões exuberantes. Após o corte de cabeça e pés, ocorre o primeiro transpasse, e as aves passam a ser penduradas pelas coxas, e seguem para a nórea de evisceração.

7.1.10. Evisceração

A evisceração já é considerada área limpa do abate, e consiste em um conjunto de operações realizadas mecanicamente, com a retirada das vísceras comestíveis e não comestíveis, e posterior inspeção *post-mortem* das vísceras e carcaças. A primeira etapa da evisceração é a oclusão e extração da cloaca, seguida pela sucção via vácuo das fezes que possam estar presentes na porção final do intestino, etapa muito importante pois reduz a possibilidade de contaminação fecal. Posteriormente, as carcaças seguem para o processo de abertura da cavidade abdominal. Diariamente um operador da qualidade avalia 100 carcaças, uma vez ao turno, afim de avaliar a eficácia de ambos os processos, devendo estar dentro dos limites máximos aceitos para não conformidades, sendo 8% para cloacas não extraídas e 5% para cavidades não abertas.

Sequencialmente as carcaças passam pela eventração, onde ocorre a remoção automática das vísceras, que são transferidas para uma nórea de vísceras,

que segue juntamente com a sua respectiva carcaça, mas em nóreas diferentes. A qualidade também verifica a eficácia do processo de eventração, uma vez por turno 100 carcaças são verificadas na saída da máquina eventradora, tendo uma tolerância de 3% para carcaças não evisceradas.

Após a evisceração ocorre a inspeção *post-mortem*, realizada pelo Serviço de Inspeção Federal, com o objetivo de julgar a sanidade das carcaças e vísceras e destiná-las ao aproveitamento total, parcial, condicional, ou então condená-las. Há três linhas de inspeção, linha A, B e C. Na linha A realiza-se o exame interno da carcaça, através de inspeção da cavidade torácica e cavidade abdominal, exame de pulmões, rins, órgãos sexuais e sacos aéreos. Na linha B realiza-se exame das vísceras que foram previamente retiradas na evisceração, como fígado, coração, moela, intestino, baço, ovários e ovidutos (em poedeiras). Já na linha C ocorre a inspeção da parte externa da carcaça, como pele e articulações. Em caso de contusões, membros fraturados, calosidades, abscessos superficiais e localizados, os mesmos devem ser removidos.

Após serem inspecionadas, as carcaças com aproveitamento total seguem para o processo de extração automática de esôfago, papo, traquéia, pescoço e sambiquira. O pescoço e a sambiquira serão direcionados para seus respectivos chillers, e as demais porções serão direcionadas para a fábrica de subprodutos. Já as carcaças que foram julgadas como inaptas para o aproveitamento total, são transferidas para a nórea de condicionais, sofrendo os cortes necessários, seguindo então para o chiller de condicionais. Quando condenadas, as carcaças e vísceras seguem para a fábrica de subprodutos. Nesta etapa do processo, um operador da qualidade monitora 100 carcaças, uma vez por turno, afim de verificar a eficácia do processo de extração do papo, esôfago e da traquéia, devendo ser 100% eficaz.

As vísceras aptas ao processamento seguirão na nórea de vísceras, para serem então separadas as vísceras comestíveis (coração, fígado e moela) das vísceras não comestíveis. As vísceras comestíveis são processadas em seção adequada, as moelas são abertas, lavadas internamente e a cutícula interna é removida. Retira-se o saco pericárdico do coração, assim como a vesícula biliar do fígado. Após preparação, as vísceras comestíveis seguem imediatamente para o pré-resfriamento, e as vísceras não comestíveis para a fábrica de subprodutos.

Após a inspeção das carcaças, se encontra o PCC 2B, este Ponto Crítico de Controle tem como finalidade retirar do processo qualquer carcaça que apresente

contaminação gastrointestinal, evitando assim, a contaminação cruzada, principalmente no chiller. Este PCC é monitorado constantemente por auxiliares de controle da produção (ACPs), que verificam 100% das carcaças durante todo o processo produtivo, e além disso, um operador do controle da qualidade, verifica 300 carcaças, três vezes por turno, afim de verificar a eficiência da monitoria realizada pelos funcionários, sendo que nenhuma carcaça com contaminação gastrointestinal pode chegar ao chiller. Os frangos que contenham alguma contaminação são pendurados em ganchos próprios para este fim, e as partes contaminadas serão removidas e condenadas, já as partes não contaminadas, retornam para a etapa de repasse, para nova avaliação. Depois de passar pelo PCC 2B, as carcaças seguem para lavagem final, que objetiva a remoção de resíduos e sujidades, seguindo então para o pré-resfriamento.

7.1.11. Resfriamento de carcaças e vísceras

O pré-resfriamento é a fase inicial do processo de conservação e, por isso, tem fundamental importância na qualidade do produto final. Tem como finalidade retardar o desenvolvimento de micro-organismos próprios das aves ou adquiridos na fase de abate, além de conter as reações enzimáticas e evitar o desgaste de equipamentos de refrigeração e congelamento dos produtos finais. O sistema de resfriamento de carcaças da C.Vale é composto por um pré-chiller e um chiller, que funcionam com água e gelo, na mesma proporção. No pré-chiller, a temperatura máxima da água que é permitida é 16°C, e as carcaças não devem permanecer por mais de 30 minutos no pré-chiller, além disso, a água deve ter renovação constante e em sentido contrário ao das carcaças, na proporção mínima de 1,5 litros por carcaça (BRASIL, 1998a).

Após passarem pelo pré-chiller, as carcaças serão destinadas ao chiller principal, segundo a Portaria nº 210, a temperatura da água no chiller não deve ser superior a 4°C, e a renovação da água deverá ser constante e em sentido contrário à movimentação das carcaças, na proporção mínima de 1,0 litros por carcaça (BRASIL, 1998a). As carcaças permanecem por aproximadamente 35 minutos no primeiro chiller, e 25 minutos no segundo chiller. A temperatura final das carcaças após todo o processo de pré-resfriamento, deverá ser igual ou inferior a 7°C (BRASIL, 1998a).

Com relação aos pés, fígado, moela, coração, sambiquira, pescoço e os condicionais, o pré-resfriamento é realizado através de imersão em chillers específicos, com adição de água e gelo, em igual proporção, onde a água não pode estar em temperatura superior a 4°C, com renovação constante e em contracorrente, e volume de 1,5 litros por kg de produto. Ao final do pré-resfriamento esses produtos devem estar com temperatura igual ou inferior a 7°C (BRASIL, 1998a), e serão classificados e acondicionados em suas embalagens primárias e secundárias.

A temperatura e a vazão de água do pré-chiller e dos chillers são verificados a cada uma hora por monitor, e duas vezes por turno, por um operador da qualidade.

7.1.12. Gotejamento

Gotejar a carcaça é essencial para eliminar o excesso de água aderido a mesma, que foi adquirido durante o pré-resfriamento sob imersão em tanques de água e gelo. O gotejamento deve ser realizado logo após o processo de pré-resfriamento, as carcaças são penduradas em nóreas, na saída do chiller, que dispõem de calha coletora de água de gotejamento. Ao final desta fase, a absorção de água nas carcaças de aves que foram previamente submetidas ao pré-resfriamento por imersão, não deverá ultrapassar 8% do peso da ave antes do pré-resfriamento (BRASIL, 1998a). Para verificar a garantia deste parâmetro, diariamente são realizados testes de absorção de água em carcaças após saírem do pré-resfriamento.

O método de verificação da absorção de água, segue a Portaria N° 210 (BRASIL, 1998a), sendo realizado a cada duas horas por funcionário treinado para realização do teste. Deve-se pesar e identificar 10 carcaças antes do pré-resfriamento (Peso Inicial), e depois das carcaças serem resfriadas e passarem pelo gotejamento, as carcaças previamente marcadas são retiradas da linha, pesando-as novamente (Peso Final), então realiza-se o cálculo da porcentagem de absorção de água:

$$\% \text{absorção: } \frac{(\text{Peso Final} - \text{Peso inicial}) \times 100}{\text{Peso Inicial}}$$

A absorção de quantidade considerável de água pelas carcaças, pode se constituir como fraude contra o consumidor, por isso é extremamente importante que a indústria garanta que depois da etapa de gotejamento, as carcaças não ultrapassem 8% de absorção de água. Após o gotejamento, as carcaças que serão vendidas inteiras, com ou sem miúdos, recebem a embalagem primária e vão para o túnel de

congelamento, o mesmo ocorre com os miúdos comestíveis, onde a moela, o coração e o fígado recebem a embalagem primária e secundária e são destinados ao túnel de congelamento.

7.1.13. Cortes e Embalagem primária

Após o gotejamento as carcaças são penduradas em nóreas, e serão destinadas para os cortes, para a desossa, ou para embalagem, dependendo da ordem de produção. O abatedouro da C.Vale possui duas salas de cortes, uma semi manual e a outra automatizada. Ao entrarem na sala de cortes as carcaças passam por um sistema de balança aérea de linha, que as classifica por peso e por qualidade, em A ou B. As carcaças classificadas com qualidade A, e que estejam dentro da faixa de peso programada, serão direcionadas para corte automático (ACMX). Já as carcaças com qualidade A ou B provenientes dos condicionais, e que estejam fora da faixa de peso programada, são direcionadas ao corte manual (cone).

A sala de desossa é climatizada, com temperatura ambiente igual ou inferior a 12°C (BRASIL, 1998a), retardando o crescimento microbiano na superfície dos cortes e favorecendo uma melhor conservação e qualidade ao produto final. A temperatura da sala é rigorosamente controlada, sendo monitorada constantemente, e verificada por operador da qualidade.

Na sala de cortes, são produzidos os mais diversos produtos: o peito é produzido sem osso e sem pele, podendo ser filé de peito inteiro, filé de peito Schnitzel (meio peito cortado ao meio), retalhos de peito, filé sassami com ou sem tendão, cartilagem do peito, etc. As pernas podem ser comercializadas juntas (coxa e sobrecoxa) ou separadas (coxa ou sobrecoxa), dependendo da exigência do cliente, podendo ser com osso e com pele, sem osso e sem pele, ou sem osso e com pele. A asa é fabricada e vendida em cortes, como coxinha da asa, meio da asa, e ponta da asa, outros produtos como meio da asa com ponta, e meio da asa cortado ao meio também podem ser produzidos. Além disso, a C.Vale destina alguns cortes para serem embalados e vendidos como frango à passarinho.

Todo o processo de desossa resulta em significativa perda de carne que ainda permanece aderida aos ossos, por isso a C.Vale produz o CMR e o CMS ou seja carne mecanicamente recuperada e carne mecanicamente separada, que de maneira geral, é toda carne recuperada ou separada dos ossos por meio de processo mecânico com

auxílio de máquinas apropriadas. O CMS é um produto feito de carnes obtidas por processo mecânico de moagem e separação dos ossos, destinados à elaboração de outros produtos cárneos industrializados específicos, o mesmo deve ser imediatamente congelado. Todos os produtos destinados ao CMS são recolhidos por calhas, e serão processados em sala separada da sala de cortes, especial do CMS, assim como o CMR. A matéria-prima utilizada na produção do CMS de frango são dorso, pescoço, cartilagem do peito e ossos da coxa.

Cada um desses produtos possuem especificações diferentes, os padrões de cada produto dependem da exigência do mercado (interno e externo) e do cliente, e devem ser rigorosamente seguidos. Para garantir que cada produto tenha suas especificações mantidas, a C.Vale possui funcionários treinados que fazem a inspeção contínua dos cortes, são os auxiliares de controle da produção. Além disso, a inspeção também é realizada pelos operadores da qualidade, que devem verificar todos os produtos da sala de cortes diariamente.

A frequência de verificação, a quantidade de peças e o que deve ser avaliado está contido em planilhas para cada produto, e dependem das exigências do cliente, por exemplo, cortes destinados ao mercado externo são verificados a cada 40 minutos pela qualidade, com uma amostragem de 50 produtos, para garantir que os padrões exigidos pelo cliente estejam sendo cumpridos.

Já os cortes destinados ao mercado interno, são inspecionados com uma frequência menor, quatro a oito vezes por turno, com uma amostragem de 50 produtos, dependendo do produto. Além de inspecionar todos os produtos, os operadores de qualidade devem verificar constantemente a temperatura dos produtos, não devendo exceder 7°C. Também são responsáveis por verificar a gramatura de alguns produtos específicos, e a limpeza, organização, fluxo, rótulos e embalagens primárias na sala de cortes.

Os cortes produzidos, após serem inspecionados, recebem a embalagem primária e são conduzidos para o setor de embalagem secundária, e então ao túnel de congelamento. Alguns produtos, como frango à passarinho, filé sassami, e coxinha das asas são congelados por congelamento individual rápido (IQF), e recebem sua embalagem primária depois de congelados. Os demais produtos, vão para o túnel de congelamento depois de embalados.

7.1.14. Embalagem secundária

Os cortes que contenham a embalagem primária, e que sofreram prévio processo de congelamento, ou não, recebem a embalagem secundária, em sala específica destinada a esse fim. A embalagem primária contém o rótulo e a data de produção e vencimento do produto, entre outros dados importantes, e a embalagem secundária, recebe uma etiqueta na qual é informado, entre outras coisas, a data de fabricação e a data de validade do lote, possibilitando assim, a rastreabilidade do produto.

Depois de embalados os produtos vão para o túnel de congelamento, e a temperatura destes produtos é rigorosamente controlada, sendo este o PCC 3B, verificado por um auxiliar de controle da produção. Para os produtos entrarem no túnel de congelamento sua temperatura deve ser igual ou inferior a 10°C. Além disso, controla-se também o tempo que o produto leva para atingir a temperatura de 4°C dentro do túnel de congelamento, desde o momento que a ave saiu da sangria, sendo que esse tempo não deve ser superior a 4 horas, de acordo com a Circular 668 (BRASIL, 2006c).

Ao saírem do túnel de congelamento os produtos passam pelo PCC 4F, o detector de metais. Devido a grande produção a C.Vale possui vários detectores de metais, para as diversas linhas. O detector de metais acusa a presença de corpos estranhos como metal, alumínio, ferro, inox, e curativos azuis, crachas, e canetas (todos fornecidos pela C.Vale, contendo metal que será acusado pelo detector de metais). Quando a presença dos corpos estranhos descritos acima for detectada, a esteira que conduz os produtos será bloqueada, e a caixa que contém o corpo estranho é automaticamente retirada da linha, para que o corpo estranho seja encontrado e removido.

A C.Vale possui um monitor encarregado por cada detector de metal, esse funcionário é responsável por abrir e encontrar o corpo estranho presente nas caixas que foram retiradas da linha pelo detector de metais. Quando encontrar o corpo estranho o funcionário deve anexá-lo a uma planilha, juntamente com a data, a hora e o tipo de produto em que esse corpo estranho foi encontrado. Além disso, o funcionário é responsável por realizar um teste para a verificação do funcionamento do detector. Esse teste é realizado a cada 30 minutos, utilizando três corpos de prova constituídos de materiais diferentes como ferro, alumínio e inox (Figura 37).



FIGURA 37. Corpos de prova para o detector de metais (Fonte: Arquivo pessoal).

O funcionário retira uma caixa da esteira de produtos, que passará pelo detector de metais, e coloca um corpo de prova dentro da caixa, devolvendo a mesma para a esteira. Ao passar pelo detector de metais, o mesmo deve imediatamente reconhecer o metal e retirar a caixa da linha. O funcionário deve realizar esse procedimento com todos os corpos de prova, e então deve passar a caixa mais uma vez pelo detector de metais, mas dessa vez, sem nenhum corpo de prova, para verificar a acurácia do teste, não podendo haver nenhum outro metal presente na caixa, que não fossem os corpos de prova. O operador de qualidade deve verificar a realização do teste e o funcionamento do detector de metais duas vezes ao turno. Depois de passarem pelo detector de metais as caixas serão tampadas, e seguirão para a paletização.

7.1.15. Paletização

No setor da paletização as caixas tampadas são empilhadas formando paletes de tamanhos diferentes, dependendo do produto e da exigência do consumidor. Um operador de qualidade monitora o período de permanência dos paletes na sala de paletização, sendo que os produtos não podem permanecer mais de três horas na montagem de paletes. Se passado o tempo de montagem dos paletes, os mesmos devem ser imediatamente destinados à camara de estocagem.

Depois do formado, os paletes identificados e envolvidos em filmes de polietileno, utilizado para evitar o deslocamento das caixas, são destinados para a

câmara de estocagem, onde permanecem armazenados até o momento de serem expedidos, seguindo o *layout* de distribuição dos produtos, controlado pelo sistema de estocagem. A temperatura da câmara é controlada e deve permanecer inferior a -18°C (BRASIL, 1998a), garantindo a adequada conservação do produto.

7.1.16. Expedição

Com base na programação de carregamento emitida pelo departamento de comercialização, os paletes são retirados da câmara de estocagem e destinados ao setor de expedição (Figura 38), para serem carregados em caminhões trucks ou em containers e serem expedidos para o consumidor. Os veículos são vistoriados pelos operadores de qualidade, os mesmos monitoram as temperaturas de cada palete. Os paletes destinados ao mercado externo devem estar com temperatura igual ou inferior a -18°C e os paletes que serão destinados ao mercado interno devem estar com a temperatura igual ou inferior a -12°C , já os paletes de CMS, independente do mercado para qual serão enviados, devem estar com temperatura de -18°C (BASIL, 1998a). Se o palete não atingir a temperatura adequada, o mesmo deverá voltar para câmara de estocagem.



FIGURA 38. Palete na doca de expedição (Fonte: Arquivo pessoal).

Além do controle da temperatura dos paletes, os operadores de qualidade realizam a certificação dos produtos que serão expedidos. A certificação é uma exigência de alguns clientes do mercado externo, e é realizada pela equipe do controle de qualidade. A equipe da certificação verifica 20 caixas de um container, afim de certificar que o container está sendo carregado com o produto correto, que as embalagens e rótulos condizem com o produto, que a temperatura do produto está

adequada, que o mesmo não passou por processo de descongelamento e recongelamento, e que o produto que está sendo exportado condiz com os padrões e especificações exigidos pelo cliente ou mercado específico.

Depois do container ou truck estar carregado, o mesmo será lacrado, por lacre do SIF, e então os produtos serão expedidos. Para a rastreabilidade dos produtos, um operador de qualidade deve sempre anotar o peso do produto, a temperatura, o horário de carregamento, a procedência, o destino, o número da placa do veículo e o número da nota fiscal.

7.2. GESTÃO DA QUALIDADE

Atualmente as empresas produtoras de alimentos, principalmente de origem animal, possuem a responsabilidade e o dever de garantir a qualidade higiênico-sanitária e tecnológica de seus produtos. Principalmente quando consideramos os perigos que podem estar presentes em uma indústria, sendo eles de natureza química, física, microbiológica ou alergênicos, passíveis de veiculação pelo consumo de alimentos e capazes de causar moléstias em humanos e animais. Além da importância na saúde pública, as perdas de alimentos e matérias-primas em decorrência de deterioração microbiológica, infestação por pragas e processamento industrial ineficaz, se tornou inadmissível (BRASIL, 1998b). Em vista disso, a implantação de sistemas de controle de qualidade se tornou essencial para as indústrias alimentares.

O sistema de gestão de qualidade da C.Vale é voltado a atender aos requisitos dos clientes, a legislação voltada a segurança dos alimentos, fraude econômica, proteção ao consumidor, bem-estar animal, sustentabilidade, melhoria contínua de pessoas, processos e produtos, e resultados para a empresa, como diminuição de custos, de desperdícios e aumento da produtividade. A gestão da qualidade também é voltada a atender o sistema de Gestão de Qualidade ISO 9001, e as demais certificações como BRC e APPCC. Está estabelecida através de procedimentos, manuais e planos documentados, onde estão definidos controles, afim de verificar a eficácia e melhoria contínua dos processos. A equipe é formada por analistas, operadores, coordenadores e encarregada da gestão da qualidade. Os principais programas e certificações adotados pela indústria e seus objetivos, são:

7.2.1. Sistema de qualidade ISO 9001

A ISO 9001 é uma norma de sistema de gestão da qualidade, reconhecida internacionalmente, que visa aumentar a satisfação do cliente, cumprir a legislação vigente referente aos produtos, padronizar processos e melhorar continuamente a qualidade dos produtos, reduzindo custos. Na C.Vale, o sistema é implementado para todos os produtos, sendo estabelecidos procedimentos para o atendimento a todos os requisitos do sistema. Através da ISO 9001 a indústria melhora a prestação de serviço ao cliente, o monitoramento do ambiente de trabalho, a verificação da satisfação dos colaboradores, fornecedores e clientes, além de melhorar os processos internos e melhorar continuamente o sistema de gestão da qualidade. Também é usado para medir o nível de satisfação dos clientes, melhorando a eficácia da gestão de qualidade da empresa, conferindo maior organização, produtividade e credibilidade a indústria (ISO, 2016).

7.2.2. Norma BRC

A Norma Global de Segurança Alimentar do BRC foi desenvolvida pelo Consórcio de Varejo Britânico, sendo particularmente adequada para empresas que fornecem produtos alimentares para varejistas do Reino Unido. Esta norma especifica os critérios de segurança e de qualidade na fabricação de alimentos, garantindo assim, a produção de alimentos seguros e saudáveis. Abrange um escopo amplo nas áreas de segurança do produto, bem como responsabilidades de auditorias legais, do fornecedor e do varejista (BRC GLOBAL STANDARDS, 2016).

Os principais requisitos da norma são a adoção e implementação de um sistema APPCC, um sistema de gestão da qualidade eficaz e documentado e um controle de produtos, processos, equipe e normas ambientais de fabricação (BRC GLOBAL STANDARDS, 2016). A Norma BRC é reconhecida mundialmente, e demonstra o nível de competência da indústria em matéria de APPCC, higiene, segurança alimentar e sistemas de qualidade, assim como o compromisso da indústria com a segurança do consumidor.

7.2.3. Programa 5S

O Programa 5S atua em função da qualidade total, em conjunto com a aplicação de melhorias contínuas, treinamento e conscientização dos funcionários, proporcionando vários benefícios ao setor, como ordem, limpeza, disciplina e bem-estar. É um programa de melhorias, que visa a melhoria do ambiente de trabalho, maior satisfação dos trabalhadores, conservação de bens, e ainda auxilia na obtenção de melhores resultados de produtividade. Inicialmente o programa se baseava em cinco conceitos, mas atualmente o programa já trata de dez conceitos, sendo eles: Senso de utilização, senso de ordenação, senso de saúde, senso de limpeza, senso de autodisciplina, senso de determinação e união, senso de treinamento, senso de economia e combate aos desperdícios, senso dos princípios morais e éticos e senso de responsabilidade social (5S, 2016). Auditorias internas mensais do Programa 5S são realizadas, afim verificar se os setores do abatedouro estão cumprindo o plano.

7.2.4. Programas de autocontrole

Os programas de autocontrole são instrumentos de gerenciamento de matéria-prima, instalações e equipamentos, pessoal e metodologia de produção, visando atender a legislação e a segurança dos alimentos. Estão estabelecidos conforme instruções contidas nas circulares nº 175 (BRASIL, 2005a) e nº 176 (BRASIL, 2005b).

São eles: Manutenção das instalações e equipamentos industriais; Manutenção dos vestiários, dos sanitários e barreiras sanitárias; Manutenção da iluminação e da ventilação; Programa de controle de Águas de abastecimento e águas residuais; Controle integrado de pragas; Limpeza e sanitização; Higiene e hábitos higiênicos; Treinamento e saúde dos operários; Procedimentos Sanitários das Operações; Controle de matéria-prima, ingredientes e material de embalagem; Controle de temperaturas; Calibração e aferição dos equipamentos de controle do processo; Verificação do programa APPCC; Verificação de testes laboratoriais; Embasamento para certificação; Controle de adição de água aos produtos; Controle de formulação; Bem-estar animal e Lavagem de carcaças.

Os analistas da qualidade são responsáveis pela implantação e manutenção dos programas de autocontrole, os quais se fundamentam na inspeção do processo e na revisão dos registros de monitoramento dos programas na indústria.

7.2.4.1. Programa APPCC

O Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) visa atender os requisitos legais do Ministério da Saúde e do MAPA, bem como as legislações e diretrizes internacionais, destacando-se a garantia de alimento seguro ao consumidor, embasamento técnico-científico para o controle dos perigos biológicos, físicos, químicos e alergênicos, garantir o comprometimento dos funcionários, a melhoria dos processos, melhoria da qualidade, a redução de custos, garantia de saúde ao consumidor e credibilidade no mercado. O APPCC foi implementado de acordo com a Portaria nº 46 (BRASIL, 1998b).

O APPCC não é um programa isolado, mas é parte de um sistema de garantia de qualidade, possuindo alguns programas de pré-requisitos para sua implantação em uma indústria: como BPF, PPHO, PSO, Programa 5S, Controle integrado de pragas, Rastreabilidade, Bem-estar animal, Programa de qualidade de fornecimento, Programa de controle de *Salmonella*, etc.

O sistema APPCC é implementado para todos os produtos da indústria, e tem como intuito assegurar a identificação e análise dos problemas que possam afetar a qualidade do produto final. No plano estão listados todos os perigos potenciais associados a cada etapa do processo, assim como análises de riscos e medidas para controlar os perigos identificados, definindo assim os PC e os PCC. Realiza-se monitoramento de cada PCC, para assegurar que todos os PCC estão sendo mantidos dentro dos limites críticos estabelecidos. Também estão estabelecidas medidas corretivas para quando o monitoramento indicar que um PCC não está controlado, assegurando que sempre que essas medidas forem adotadas, o processo volte a normalidade. O plano é revisado anualmente, ou quando houverem alterações que possam afetar a segurança do produto, para assegurar o correto funcionamento do plano.

7.2.4.2. Procedimento Padrão de Higiene Operacional (PPHO)

O Programa de Higiene Operacional das três linhas do abatedouro de aves está descrito e catalogado, de acordo com a Circular nº 272 (BRASIL, 1997a), seguindo a RDC nº 275 (BRASIL, 2002) e objetiva prevenir a contaminação cruzada dos produtos, e garantir a segurança dos funcionários envolvidos nas atividades de higienização. O Programa trata da higienização operacional e pré-operacional, realizada diariamente na indústria.

A higiene operacional realizada durante o processo de abate, consiste em retirar os resíduos de matéria orgânica dos pisos, calhas, máquinas, etc., mantendo as áreas do abatedouro limpas e organizadas e mantendo os pisos secos. Durante os intervalos dos turnos, os resíduos do processo são retirados dos equipamentos, das calhas, dos pisos, esteiras, etc., assim como limpeza e organização do ambiente. Nas trocas de turno o chão e os equipamentos são enxaguados com água, para limpeza superficial e retirada de resíduos.

Ao final de cada dia de abate, realiza-se a limpeza em todos os setores da produção, exceto os setores de paletização, expedição e túnel espiral (realizados semanalmente), esta é a higiene pré-operacional, realizada no terceiro turno, por equipe especializada, de acordo com a Circular nº 175 (BRASIL, 2005a). Os procedimentos de limpeza e sanitização pré-operacionais são realizados através de enxágue, detergência, esfrega (se necessário), enxágue, sanitização e novo enxágue. Esta higienização é iniciada pela recepção das aves, seguindo até a expedição, incluindo equipamentos, pisos, paredes, trilhos, ganchos, tubulações e pias. Os equipamentos devem ser lavados sempre no sentido de cima para baixo, para o escoamento, até não conter nenhum tipo de resíduo, tanto de matéria orgânica, quanto de detergentes e sanitizantes.

Ao final da higienização, uma equipe de operadores da qualidade realizam o monitoramento da higienização de todos os setores para identificar possíveis pontos de não conformidade, solicitando nova lavagem, quando necessário, e liberando o setor. Além disso, os operadores de qualidade são responsáveis pela coleta de *swabs* de esteiras, de equipamentos, e de nórias, que serão enviados ao laboratório da C.Vale, afim de verificar se o processo de higienização está sendo realizado de forma eficaz. Após todo o processo de higienização o serviço de inspeção federal faz a

verificação e a liberação de algumas áreas, as quais são sorteadas diariamente. Os pontos de não conformidade são registrados em check lists diários.

7.2.4.3 Boas Práticas de Fabricação (BPF)

As Boas Práticas de Fabricação são procedimentos aplicados à indústria de alimentos necessários para o controle de matéria-prima, produção, armazenamento e transporte de produtos, de forma a prevenir a contaminação dos alimentos, ou seja, para garantir alimentos seguros. Por isso possuem importância fundamental na indústria, pois evitam intoxicações, infecções ou toxinfecções alimentares causadas por contaminação microbiológica.

Em acordo com a Portaria nº 326 (BRASIL, 1997b), o programa envolve higiene e saneamento das instalações e estabelecimentos, higiene pessoal, higiene na elaboração dos produtos, prevenção da contaminação cruzada, controle de metais, controle da qualidade do produto final, etc. Os operadores da qualidade monitoram todo o processo de abate diariamente, afim de verificar se as boas práticas de fabricação estão sendo realizadas corretamente.

8. CONCLUSÃO

Durante o período do estágio pude acompanhar a preparação de meios de cultura e do material utilizado nos laboratórios, a execução de diversas análises microbiológicas e físico-químicas de alimentos, e discussões de artigos e acompanhamento de projetos de pesquisas desenvolvidos em ambos os laboratórios. Além disso, no abatedouro de aves da C.Vale, acompanhou-se as diversas atividades realizadas pela gestão da qualidade, como a atividade dos operadores e analistas da qualidade, também houve o acompanhamento do processo produtivo, de auditorias internas e externas, leitura dos manuais e POPs, etc. Através dessa experiência concluiu-se que o estágio supervisionado é fundamental para o início da vivência extra acadêmica, pois permite que se aplique na prática os conhecimentos adquiridos ao longo da graduação, além da formação de um senso crítico na tomada de decisões, e no amadurecimento, transformando o aluno em um profissional.

8. REFERÊNCIAS

3M™ BRASIL™ PETRIFILM. Guia de interpretação para contagem de aeróbios. Sumaré, São Paulo, 2016. Disponível em: <www.3mfoodsafety.com.br>. Acesso em: 24 de Agosto de 2016.

5S. Soluções Criativas em Comunicação. Disponível em: <<http://5s.com.br/>>. Acesso em 30 de outubro de 2016.

BARTELS, H. *Inspección Veterinária de la Carne*. Editora Acriba, Zaragoza, Espanha, 1971. p. 485.

BELL, C. & KYRIAKIDES, A. *Salmonella: A practical approach to the organism and its control in foods*. Osney Mead, Oxford: Blackwell Science, 2002. 338 p.

BELOTI, V. *Leite: Obtenção, Inspeção e Qualidade*. Londrina: Editora Planta, 2015. 417 p.

BRASIL. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Reinspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal. Título XIII, de 29 de março de 1952. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1952.

BRASIL. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal – DIPOA. Implantação do Programa de Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (PPHO) e do Sistema de Análise de Risco e Controle de Pontos Críticos (ARPC) em estabelecimentos envolvidos com o comércio internacional de carnes e produtos cárneos, leite e produtos lácteos e mel e produtos apícolas. Circular número 272 de 22 de dezembro de 1997. Brasília, Ministério da Agricultura, 1997a.

BRASIL. Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde – SVS/MS. Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. Portaria SVS/MS número 326 de 30 de julho de 1997. Brasília, Ministério da Saúde, 1997b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carne de Aves. Portaria número 210 de 10 de Novembro de 1998. Brasília: Ministério da Agricultura, 1998a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual genérico de procedimentos para APPCC em indústrias de produtos de origem animal. Portaria número 46 de 10 de fevereiro de 1998. Brasília: Ministério da Agricultura, 1998b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel. Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000. Brasília: Ministério da Agricultura, 2000.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Resolução - RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/>>. Acesso em: 24 de Agosto de 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. Resolução – RDC nº 275 de 21 de outubro de 2002. Diário Oficial da União, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Brasília: Ministério da Agricultura, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Procedimentos de Verificação dos Programas de Autocontrole. Circular número 175 de 16 de maio de 2005. Brasília, Ministério da Agricultura, 2005a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Modificação das Instruções para a verificação do PPHO, encaminhados pela Circular Nº 201/97 DCI/DIPOA e aplicação dos procedimentos de verificação dos Elementos de Inspeção previstos na Circular Nº 175/2005 CGPE/DIPOA. Circular número 176 de 16 de maio de 2005. Brasília: Ministério da Agricultura, 2005b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Métodos Analíticos Físico Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Brasília: Ministério da Agricultura, 2006a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Regulamento Técnico para o funcionamento de Bancos de Leite Humano. RDC nº 171, de 04 de setembro de 2006b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diretrizes para preparação de Plano de APPCC (HACCP) para o processo de abate de aves. Circular número 668, de 19 de Setembro de 2016. Brasília: DIPOA – Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, 2006c.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento Técnico do Leite. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Brasília, Ministério da Agricultura, 2011a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Depressão do ponto de congelamento do leite fluído. Método de Ensaio, de 04 de Outubro de 2011. Rio Grande do Sul, Laboratório Nacional Agropecuário, 2011b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial da *Salmonella* spp. Série A. Normas e Manuais Técnicos. 1º Edição. Brasília, 2011c. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/bvs>>. Acesso em: 23 de Agosto de 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Portaria nº 2.914 de 12 de dezembro de 2011, Brasília, Ministério da Saúde, 2011d.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Pesquisa de Peroxidase em Leite Fluído. Método de Ensaio, de 11 de junho de 2012. Rio Grande do Sul, Laboratório Nacional Agropecuário, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Determinação da densidade em leite fluído com uso do termolactodensímetro. Método de Ensaio, de 29 de setembro de 2013. Rio Grande do Sul, Laboratório Nacional Agropecuário, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Determinação de lipídios em leite fluído pelo Método de Gerber. Método de Ensaio, de 07 de agosto de 2014. Rio Grande do Sul, Laboratório Nacional Agropecuário, 2014a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Determinação da acidez em mel por potenciometria. Método de Ensaio, de 21 de agosto de 2014. Rio Grande do Sul, Laboratório Nacional Agropecuário, 2014b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Prova de Lund. Método de Ensaio, de 17 de agosto de 2014. Rio Grande do Sul, Laboratório Nacional Agropecuário, 2014c.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Prova para amônia em pescados (Prova de Éber). Método de Ensaio, de 18 de julho de 2014. Rio Grande do Sul, Laboratório Nacional Agropecuário, 2014d.

BRC GLOBAL STANDARDS. Disponível em: <<http://www.brcglobalstandards.com/>>. Acesso em 30 de outubro de 2016.

CDC. Center for Disease Control and Prevention. *Foodborne Germs and Illnesses*. Atlanta, Georgia, 2015. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/foodsafety/foodborne-germs.html>>. Acesso em 20 de Julho de 2016.

CODEX ALIMENTARIUS. General guidelines for use of the term “Halal”. 1997. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/005/y2770e/y2770e08.htm#TopOfPage>>. Acesso em: 30 de Outubro de 2016.

CVALE. Cooperativa Agroindustrial C.Vale. Disponível em: <www.cvale.com.br>. Acesso em: 12 de Outubro de 2016.

EMBRAPA. Manual de procedimentos de amostragem e análise físico-química de água. Embrapa Florestas, Colombo, Paraná, 2011.

FAO – Food and Agriculture Organization. FAO discute demanda mundial por alimentos. Brasília, Brasil, 2016. Disponível em: <<https://www.fao.org.br/FAOddma.asp>>. Acesso em 20 de Julho de 2016.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Atheneu, 2008. 182 p.

FUNASA. Fundação Nacional da Saúde. Manual prático de análise de água. 2. ed. rev. - Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2006.

GALVANI, F.; GAERTNER, E. Adequação da Metodologia Kjeldahl para determinação de Nitrogênio Total e Proteína Bruta. Circular Técnica 63, Embrapa, Corumbá, Mato Grosso do Sul, 2006.

ICMSF. *Micro-organisms in foods 5*. Characteristics of microbial pathogens. First Edition. London: Blackie Academic & Professional, 1996. 513 p.

ISO. International Organization for Standardization. Disponível em: <<http://www.iso9001.com/>>. Acesso em: 30 de outubro de 2016.

JAY, J. M. *Microbiologia de Alimentos*. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p.

LUDTKE, C. B.; CIOCCA, J. R. P.; DANDIN, T.; BARBALHO, P. C.; VILELA, J. A. Abate Humanitário de aves. WSPA - Sociedade Mundial de Proteção animal. Rio de Janeiro, p.120, 2010.

LUTZ. Instituto Adolfo Lutz. *Métodos físico-químicos para análises de alimentos*. IV ed., 1º ed. digital. São Paulo, 2008. 1020 p.

MENDES, C. G.; SILVA, J. B. A.; MESQUITA, L. X.; MARACAJÁ, P. B. As Análises de mel: Revisão. *Revista Caatinga*, Mossoró, Brasil, v.22, n.2, p.07-14, 2009.

OXOID. *Bacillus cereus* selective agar base. Disponível em: <http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0617&org=9&c=UK&lang=EN>. Acesso em: 22 de Setembro de 2016.

PARANÁ. Programa Leite das Crianças – Diminuição da Desnutrição Infantil. Instrução Normativa nº 01 de 22 de novembro de 2004. Disponível em: <http://www.leitedascrianças.pr.gov.br/arquivos/File/legislacao/instrucao_normativa_01_2004.pdf>. Acesso em: 08 de julho de 2016.

POLO ELETRONICA. Cuba para atordoamento em alta frequência. Disponível em: <<http://www.poloeletronica.com.br/>>. Acesso em 30 de Outubro de 2016.

RODRIGUES, E. A.; SILVA, E. M. S.; BESERRA, E. M. F.; RODRIGUES, M. L. Análise físico-química dos méis das abelhas *Apis mellifera* e *Melipona scutellaris* produzidos em duas regiões no Estado da Paraíba. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 35, n.5, p. 1166-1171, 2005.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água*. São Paulo: Varela, 4. Ed., 624 p., 2010.

UEL. Universidade Estadual de Londrina. LIPOA – Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Disponível em: <<http://www.uel.br/laboratorios/inspecao/portal/>>. Acesso em: 01 de Agosto de 2016.

UNESP. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Acesso em: 22 de Setembro de 2016. Disponível em: <www.fmvz.unesp.br>.

USDA. United States Department of Agriculture. *Introduction to the Microbiology of Food Processing*. Food Safety and Inspection Service, 2012. Disponível em: <http://www.fsis.usda.gov/shared/PDF/SPN_Guidebook_Microbiology.pdf>. Acesso em 23 de Agosto de 2016.

USDA. United States Department of Agriculture. *Brazil, Poultry and Products Annual*. Annual Poultry Report. Foreign Agricultural Service, 2015. Disponível em: <http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Poultry%20and%20Products%20Annual_Brasilia_Brazil_8-13-2015.pdf>. Acesso em 08 de Agosto de 2016.

USDA. United States Department of Agriculture. *Dairy: Word Markets and Trade*. Foreign Agricultural Service, 2016. Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/dairy.pdf>>. Acesso em 12 de Agosto de 2016.

VALENTE, J. P. S.; PADILHA, P. M.; SILVA, A. M. M. Dissolved oxygen (DO), biochemical oxygen demand (BOD) and chemical oxygen demand (COD) as pollution parameters in the Lavapés/Botucatu - SP brook. Ecl. Quím. (São Paulo), v.22, p.49-66, 1997.

WHITE, J. W. Quality Evaluation of Honey: Role of HMF and Diastase Assays. Honeydata Corporation, Novasota, 1992.

WHO. World Health Organization. *Salmonella (non-typhoidal)*. Fact sheet number 139, 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>>. Acesso em 24 de Julho de 2016.